

**Aus dem Lehrstuhl für
Humananatomie und Embryologie**

**Direktor:
Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm**

**der naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg**

Die Lokalisation des Membranproteins PV-1 in den Gefäßen des Auges

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der naturwissenschaftlichen Fakultät III
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kathrin Ebner
aus Achslach

2011

**Aus dem Lehrstuhl für
Humananatomie und Embryologie**

**Direktor:
Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm**

**der naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg**

Die Lokalisation des Membranproteins PV-1 in den Gefäßen des Auges

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der naturwissenschaftlichen Fakultät III
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kathrin Ebner
aus Achslach

2011

Dekan:	Prof. Dr. Reinhard Sterner
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ernst R. Tamm
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Olaf Strauß
Tag der mündlichen Prüfung:	19.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Funktionen des Endothels	1
1.2 Gegenüberstellung der verschiedenen Endotheltypen.....	2
1.2.1 Kontinuierliches Endothel.....	2
1.2.2 Fenestriertes Endothel.....	3
1.2.3 Diskontinuierliches oder sinusoidales Endothel.....	5
1.3 Strukturelemente der Plasmamembran von Endothelzellen.....	6
1.3.1 Caveolae.....	6
1.3.2 Vesikulo-Vakuolare Organellen (VVO).....	11
1.3.3 Transendotheliale Kanäle (TEC).....	12
1.3.4 Fenestrae.....	14
1.4 Der Schlemm-Kanal.....	17
1.4.1 Funktion und Bedeutung des Kanals im Rahmen des Kammerwasserabflusses.....	17
1.4.2 Ultrastruktur des Kanalendothels: Giant Vacuoles und transzelluläre Poren.....	19
1.4.3 Lokalisation des Kammerwasserabflusswiderstands: Relevanz des Schlemm-Kanals.....	25
1.4.4 Unterschiede zwischen innerer und äußerer Wand des Kanals.....	29
1.5 Das Protein PV-1.....	29
1.5.1 Aufbau und Struktur.....	29
1.5.2 Lokalisation in Fenstral Diaphragmas und Stomatal Diaphragmas...	31
1.6 Ziel der Arbeit.....	33
2 Material und Methoden	34
2.1 Verwendete Chemikalien.....	34
2.2 Rezepte für Lösungen und Puffer.....	35
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	36
2.4 Geräte.....	37
2.5 Gewebe unterschiedlicher Spezies.....	38
2.5.1 Maus.....	38
2.5.2 Schwein.....	38
2.5.3 Mensch.....	38
2.6 Fixierungen und Perfusionen.....	39
2.6.1 Perfusionsfixierung einer Maus.....	39
2.6.2 Immersionsfixierung.....	40
2.6.3 Fixierungslösungen.....	40
2.6.3.1 Paraformaldehyd.....	40
2.6.3.2 Paraformaldehyd und Glutaraldehyd.....	41
2.6.3.3 Ethyl- bzw. Methyl-Carnoy.....	41

2.6.3.4 PLP-Nakane.....	41
2.7 Einbettungen und Schnittanfertigung.....	42
2.7.1 Gefrierschnitte.....	42
2.7.2 LR-White	43
2.7.3 Technovit 8100 und 9100	44
2.7.4 Epon.....	46
2.8 Blockierungslösung.....	46
2.9 Antikörper	47
2.10 Zellkernfärbung bzw. Eindeckeln.....	49
2.11 Mikroskope und Kamera.....	49
2.11.1 Hellfeld-und Fluoreszenzmikroskop.....	49
2.11.2 Konfokales Mikroskop.....	49
2.11.3 Elektronenmikroskop.....	49
2.11.4 Kamera	50
2.12 Methoden.....	50
2.12.1 Postembedding-Verfahren.....	50
2.12.1.1 Fluoreszenz-Färbung.....	50
2.12.1.2 Färbung mit Goldantikörper für Lichtmikroskopie.....	51
2.12.2 Preembedding-Verfahren.....	51
2.12.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen ohne Färbung.....	52
3 Ergebnisse.....	53
3.1 Immunhistochemie.....	53
3.2 Elektronenmikroskopie.....	62
3.3 Tabellarischer Überblick über die im Rahmen der Arbeit untersuchten Kombinationen aus Fixierung, Einbettung sowie Spezies.....	68
4 Diskussion.....	71
5 Zusammenfassung.....	75
6 Anhang.....	77
6.1 Abbildungsverzeichnis.....	77
6.2 Tabellenverzeichnis.....	79
6.3 Literaturverzeichnis.....	80
6.4 Abkürzungsverzeichnis.....	86
6.5 Curriculum vitae.....	87
6.6 Danksagung.....	89
6.7 Erklärung.....	90

1 Einleitung

1.1 Funktionen des Endothels

Das Gefäßsystem des Organismus ist, unabhängig von der Lage des betrachteten Strombahnabschnittes, durchgehend von einer einschichtigen Lage aus abgeflachten, polygonalen und in Richtung der Blutströmung angeordneten Endothelzellen ausgekleidet. Im menschlichen Körper wird das Nettogewicht des Endothels auf circa 100 g, seine Oberfläche auf 1000 m² geschätzt (Jaffe 1987). Während in den Arterien, Arteriolen und Venen das Endothel die innerste Schicht eines mehrschichtigen Wandaufbaus (Tunica intima, Tunica media, Tunica adventitia) darstellt, wird die Gefäßwand in den Kapillaren und postkapillären Venolen ganz aus Endothelzellen gebildet, denen eine Basallamina sowie umgebende Perizyten untergelagert sind (Lüllmann-Rauch 2006). Die Endothelzellen sind untereinander durch verschiedenartige Zell-Zell-Kontakte wie Tight junctions, Gap junctions und Zonulae adherentes verbunden, die zum einen eine Abdichtung und somit eine Abgrenzung des Intravasalraums auf der luminalen Seite vom Extrazellulärraum auf der basalen Seite bewirken, zum anderen für interzelluläre Kommunikation sowie mechanischen Halt sorgen (Lüllmann-Rauch 2006).

Die Aufgaben der endothelialen Schicht sind aufgrund des unmittelbaren Kontaktes zum Blut vielfältig. Neben der bereits erwähnten Barrierefunktion, die einen passiven Übertritt sowohl von Blutzellen als auch von Plasmaproteinen und intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium einschränkt oder verhindert, sind Endothelzellen außerdem an der molekularen Steuerung komplexer biologischer Vorgänge wie der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, der Entzündungsreaktion mit Leukozytenmigration sowie der Regulierung der regionalen Durchblutung über Varianz des Vasotonus beteiligt (Davis und Hagen 1993).

1.2 Gegenüberstellung der verschiedenen Endotheltypen

1.2.1 Kontinuierliches Endothel

Das kontinuierliche Endothel bildet eine ununterbrochene Barriere zwischen dem Blut- und Gewebekompartiment und findet sich in den Kapillaren zahlreicher Gewebe, wie Skelett- und Herzmuskel, in der Lunge oder auch im Bindegewebe. Damit stellt dieses Endothel den am weitesten verbreiteten Subtyp dar (Drenckhahn 2004).

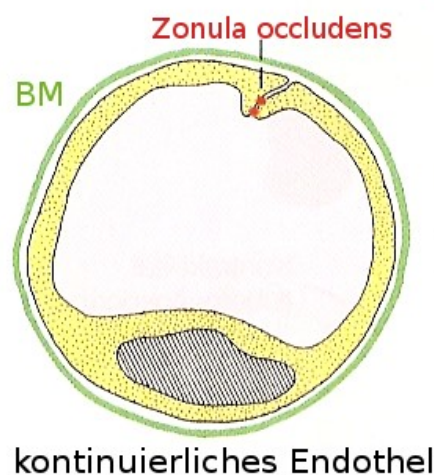
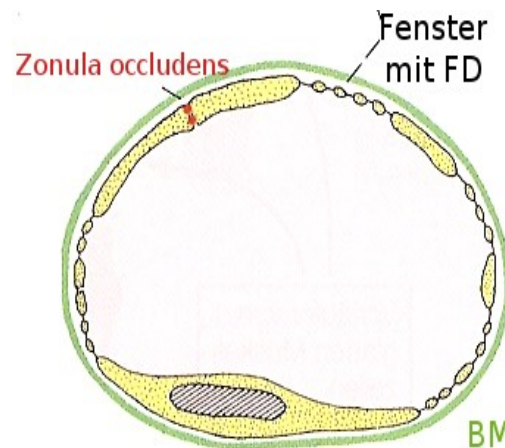


Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch kontinuierliches Endothel mit umgebender durchgehender Basalmembran (BM) (nach Drenckhahn 2004).

An plasmalemmalen Substrukturen sind zahlreiche Caveolae (s. 1.3.1) sowie einzelne transendotheliale Kanäle (TEC, s. 1.3.3) zu beobachten, die sich vor allem an Zellabschnitten außerhalb des Zellkerns bilden, da dort die Zellausläufer bis auf 0,1-0,2 μm abgeflacht sind und daher der Übertritt von Stoffen erleichtert ist (Drenckhahn 2004). Neben dem durch diese Strukturen bedingten transzellulären Stoffaustausch sind vor allem kleine hydrophile Moleküle und Wasser in der Lage, durch im Verschlussleistennetz der Zonulae occludentes befindliche Poren mit einem mittleren Durchmesser von 4 nm auf parazellulärem Weg die Endothelbarriere zu überwinden (Lüllmann-Rauch 2006). Insgesamt ist also bei diesem Endotheltyp nur eine begrenzte und selektive Permeabilität vorhanden.

1.2.2 Fenestriertes Endothel

Fenestriertes Endothel ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Fenstern, porenartigen Strukturen, die trotz des Vorhandenseins von abdichtenden Interzellularkontakten zwischen den Endothelzellen, wie den Zonulae occludentes, den Durchtritt von kleineren Molekülen, Ionen und Wasser ermöglichen (Drenckhahn 2004) (s. 1.3.4).



fenestriertes Endothel

Abbildung 2: Schematischer Querschnitt durch fenestriertes Endothel. Die Endothelzellen sind durch Interzellularkontakte miteinander verbunden, bilden jedoch transzelluläre Poren in Form von Fenstern, die durch *Fenestral Diaphragmas* (FD) abgedeckt werden, aus (nach Drenckhahn 2004).

Somit lässt sich fenestriertes Endothel in Gewebeabschnitten finden, die einer hohen Austauschrate zwischen Blut und Gewebe bedürfen, physiologischerweise also in exo- und endokrinen Drüsen, dem Plexus choroideus, der neurohämalen Region im Gehirn mit seinen zirkumventrikulären Organen, den peritubulären Kapillaren der Niere sowie der Lamina propria des Verdauungstraktes und auch der Choroidea des Auges. Als Sonderfall können die Glomeruluskapillaren behandelt werden, da ihre Fenster nicht wie in allen anderen Fällen von *Fenestral Diaphragmas* (FD) bedeckt werden (Drenckhahn 2004) (s. 1.3.4). Als pathologische Umstände, die mit der Ausbildung fenestrierter Endothelien und damit erhöhter vaskulärer Permeabilität sowie Ödembildung assoziiert sind, treten in erster Linie die Tumorentstehung bzw.

1 Einleitung

-ernährung sowie die diabetische Retinopathie mit Gefäßeinsprossung in Erscheinung. Sowohl im physio- als auch im pathologischen Zustand kommt dem VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) als Mediator erhöhter Permeabilität und Angiogenese eine herausragende Bedeutung zu: Von angrenzenden Epithelzellen gebildet, induziert VEGF in Endothelzellen *in vivo* die Bildung von Fenstern, während die Antagonisierung am VEGF-Rezeptor oder eine Störung im Signaltransduktionsweg den Verlust des fenestrierten Phänotyps zur Folge hat (Ioannidou et al. 2006).

Innerhalb einer Endothelzelle erfolgt die Anordnung der Fenster im Rahmen sog. „Siebplatten“, in denen Fenster mit regelmäßigem Abstand von etwa je 130 nm (Ballermann und Stan 2007) in ein- oder zweidimensionalen Linien bzw. Mustern angeordnet sind.

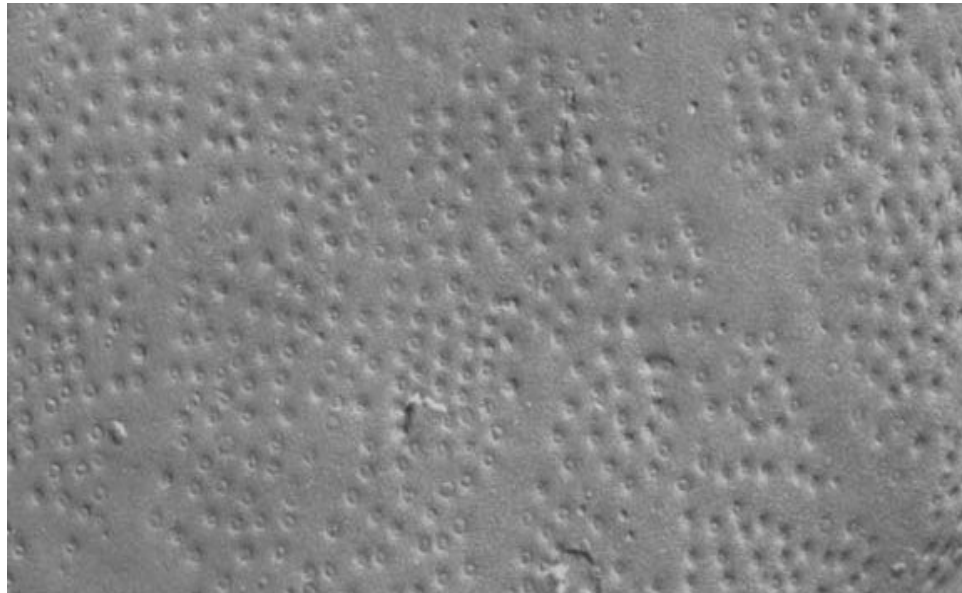


Abbildung 3: Gefrierbruch eines fenestrierten Kapillarendothels im Jejunum einer Ratte, Vergrößerung: 16.000x; erkennbar ist die durchgehend regelmäßige Anordnung der Fenestrae im Rahmen von Linien oder Clustern (aus Simionescu et al. 1974).

In der Plasmamembran des fenestrierten Endothels beobachtet man als Strukturelemente neben den Fenstern außerdem noch Caveolae (s. 1.3.1) und TEC (Drenckhahn 2004) (s. 1.3.3).

1.2.3 Diskontinuierliches oder sinusoidales Endothel

Charakteristisch für diesen Endotheltyp sind frei durchgängige Lücken und Poren, da das Blutkompartiment weder durch Diaphragmata noch durch eine durchgängige Basalmembran vom subendothelialen Gewebe getrennt wird. In der Folge ist ein Stoffaustausch über das Endothel hinweg ungehindert möglich (Drenckhahn 2004).

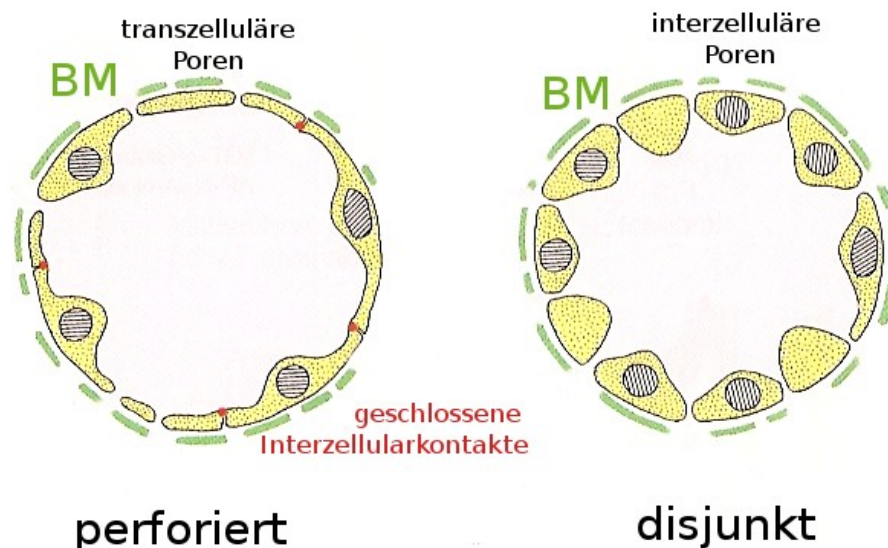


Abbildung 4: Gegenüberstellung der zwei Typen des diskontinuierlichen Endothels mit unterbrochenen Basalmembranen. Während beim perforierten Typ geschlossene Interzellularkontakte vorliegen, sind beim disjunkten Typ die Interzellularräume zu Poren erweitert (nach Drenckhahn 2004).

Mit Hinblick auf das (Nicht-)Vorhandensein von Interzellularkontakten lassen sich innerhalb des diskontinuierlichen Endothels zwei Typen differenzieren: Beim perforierten diskontinuierlichen Endothel verlaufen transzelluläre Poren mit einem Durchmesser von 0,1-0,5 μm durch das Zellinnere, doch werden die Zellen untereinander noch durch abdichtende Interzellularkontakte verbunden. Die Basallamina ist entweder - wie in den sinusoidalen Kapillaren der Leberläppchen - durchbrochen oder fehlt im Falle der Sinus des Knochenmarks ganz, sodass dort sogar neugebildete Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten über das Endothel in das Blut gelangen können.

Falls die Poren im diskontinuierlichen Endothel durch ein Fehlen von Interzellularkontakten entstehen, spricht man von einem disjunkten Endothel, über das Makromoleküle und Zellen aus dem Blut interzellulär passieren können. Konstitutiv vorhanden findet sich dieser Typ zum Zwecke der Blutzellmauserung in den Sinus der Milz, temporär stimulierbar hingegen in postkapillären Venolen im Rahmen von Entzündungen (Drenckhahn 2004).

Da im Schlemm-Kanal sowohl interzelluläre als auch temporär vorübergehende transzelluläre Poren beschrieben sind, kann sein Endothel als transient perforiertes Endothel klassifiziert werden (Drenckhahn 2004) (s. 1.4.2).

1.3 Strukturelemente der Plasmamembran von Endothelzellen

Abhängig von dem jeweiligen Subtyp der Endothelien finden sich unterschiedliche Strukturmerkmale der Plasmamembran, wie Caveolae, transendotheliale Kanäle (TEC), Vesikular-Vakuolare Organellen (VVO) oder Fenster, die zum Teil von *Stomatal Diaphragmas* (SD) oder *Fenestral Diaphragmas* (FD) bedeckt werden.

1.3.1 Caveolae

Unter Caveolae, früher auch „*Plasmalemmal Vesicles*“ genannt (Palade 1953), versteht man Plasmamembraneinstülpungen, die in fast allen Zelltypen, jedoch in stark unterschiedlichem Ausmaß, gebildet werden. Sie können einzeln oder zu mehreren, in Form sog. „Cluster“, auftreten (s. Abb. 5). Caveolae sind in vielen verschiedenen Zelltypen zu finden, als Beispiele seien in erster Linie Endothel-, aber auch Epithelzellen, Adipozyten, Muskelzellen, Fibroblasten sowie Typ-I-Pneumozyten genannt (Gumbleton et al. 2000). Obwohl Caveolae, deren mittlerer Durchmesser im Bereich von 60-70 nm liegt, häufig als kolbenförmig beschrieben werden, können sie in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung oder Funktion ebenso flach, tubulär oder als Transportvesikel in Erscheinung treten (Thomas und Smart 2008).

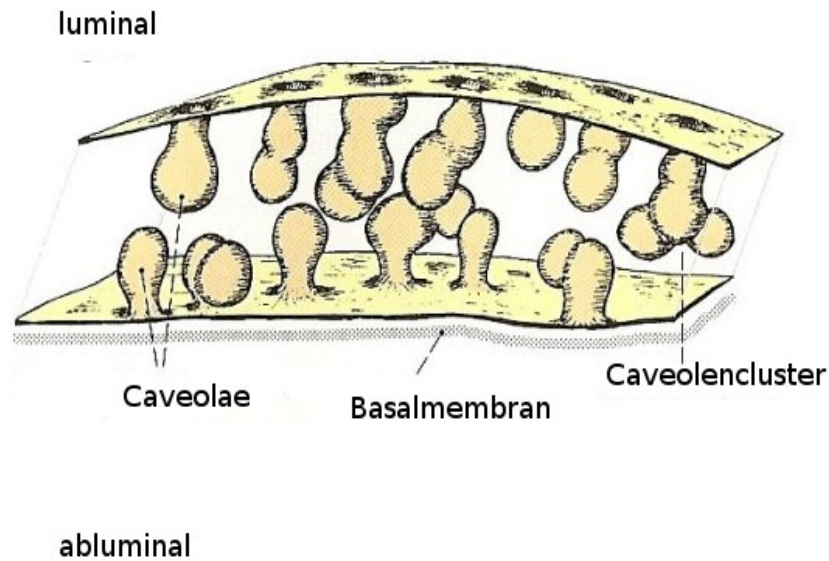


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Caveolen an der luminalen und abluminalen Seite einer Endothelzelle, in ihrer Anordnung einzeln oder zu mehreren in sog. „Clustern“ (nach Drenckhahn 2004).

Mit Hinblick auf ihren ultrastrukturellen Aufbau können Caveolae auch als Caveolin-positive *lipid rafts* verstanden werden. *Lipid rafts* wiederum sind Mikrodomänen der Plasmamembran mit höherer Ordnung als die umgebende Membran und einem hohen Gehalt an Sphingolipiden sowie Cholesterol (Thomas und Smart 2008). Caveolin seinerseits ist auf der zytosolischen Seite der Membran lokalisiert und für die Bildung, Stabilisierung sowie für Funktionen der Caveolae verantwortlich und notwendig (Lüllmann-Rauch 2006, Drenckhahn 2004, Drab et al. 2001).

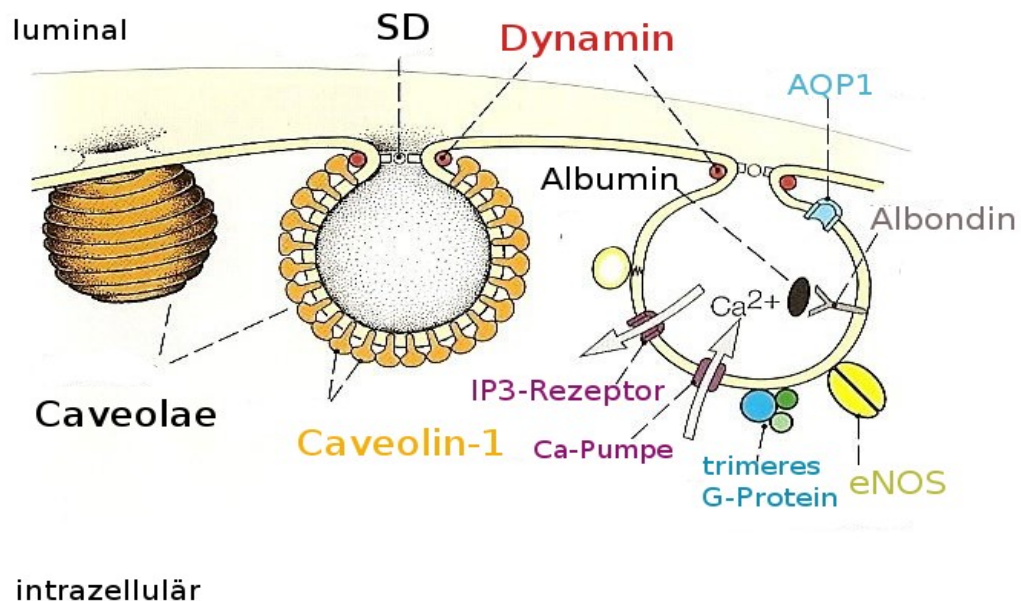


Abbildung 6: Darstellung des Aufbaus einer Caveola mit ausgewählten Transportern. Caveolin-1 als membranstabilisierendes Protein; die Abdeckung der Caveolen erfolgt durch ein *Stomatal Diaphragma* (SD). AQP1=Aquaporin1, eNOS=endotheliale NO-Synthase (nach Drenckhahn 2004).

Funktionell gesehen ist an erster Stelle die Rolle der Caveolae beim zellulären Transport mit Endo- und Exozytose zu nennen: Nach der Dynamin-vermittelten Abschnürung der Caveolenvesikel von der Plasmamembran (Oh et al. 1998) führen intrazelluläre Wege gemäß des sog. CERGA-Wegs (*Caveolae to Endoplasmic Reticulum to Golgi Apparatus*) zum Golgi-Apparat, zum Endoplasmatischen Retikulum, transzellulär an die gegenüberliegende Zelloberfläche oder wieder zurück an die aufnehmende Zelloberfläche (Gumbleton et al. 2000). Die Aufnahme und Ankonzentrierung der endozytierten Moleküle erfolgt rezeptorvermittelt, wie z.B. von Albumin über eine Bindung an Albondin, auch bekannt als gp60 (Drenckhahn 2004, Schnitzer et al. 1994, Rippe et al. 2002), was eine gewisse Selektion der Aufnahme zur Folge hat. So transportieren nicht alle Caveolae einer Endothelzelle Albumin; ebenso erfolgte bei den Perfusionsversuchen von Bendayan (2002) mit markiertem Albumin und markiertem Insulin in der Doppelfärbung der transzelluläre Transport dieser beiden Proteine nur in 1,3% der betrachteten Fälle über dieselben tubulären

bzw. vesikulären Caveolae. In den allermeisten Fällen wurden sie also über verschiedene Subgruppen von Vesikeln transportiert. IgG und Albumin hingegen scheinen in derselben Subpopulation von Caveolae transportiert zu werden (Bendayan 2002). Bei der näheren Betrachtung der für die Internalisation von Albumin verantwortlichen Vesikel beobachteten Tiruppathi et al. (1997) in eben jenen Vesikeln eine parallele Aufnahme von Flüssigkeit, die sich quantitativ in vergleichbaren Größenordnungen wie die Albuminaufnahme steigern ließ. Im Gegensatz zum transendothelialen Transport von intaktem Albumin resultiert die Aufnahme von modifiziertem Albumin in einem intrazellulären Transport zu Lysosomen mit anschließender Degradierung, womit den Caveolen auch eine selektierende Funktion in der Beseitigung von abbauwürdigem Material zugeschrieben werden kann (Gumbleton et al. 2000). Die Bedeutung der Caveolae als bestimmende Strukturen im transendothelialen Transport via Transzytose von Vesikeln ist allerdings umstritten, vor allem seit Drab et al. 2001 die Herstellung einer Caveolin1-/-Maus gelang. Obwohl deren Gewebe bei der histologischen Untersuchung keine Caveolae mehr aufweisen, ist der Albumintransport über die Blut-Hirnschranke, der - wie bislang angenommen - über Caveolen erfolgen soll, bei den Knockout-Tieren nicht vermindert. Dieses Ergebnis lässt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu: Entweder erfolgt die Transzytose des Albumins grundsätzlich über andere Strukturen, oder der Albumintransport, der normalerweise über Caveolen erfolgt, wird bei den Caveolin1-/-Mäusen durch andere Transportmechanismen ersetzt.

Neben der Endo- bzw. Exozytose von Vesikeln spielen Caveolae eine wichtige, jedoch nicht unbedingt notwendige Rolle in der Signaltransduktion. Bei der Beurteilung ihrer Bedeutung und des Mechanismus im Rahmen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren entstanden viele widersprüchliche Ergebnisse, für die Oh und Schnitzer (2001) möglicherweise eine Erklärung fanden, indem es ihnen gelang, Caveolin-positive (also Caveolae) und Caveolin-negative *lipid rafts* getrennt voneinander aus der Plasmamembran zu isolieren. G_q-Proteine binden demnach spezifisch an Caveolin, während G_s und G_i vor allem mit GPI-Ankern (Glykosylphosphatidylinositol-Anker) in lipid rafts eine Bindung eingehen. Des weiteren ist Caveolin auch an der Bindung und somit der Inaktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) beteiligt, die in

Endothelzellen über Caveolin-1, in Muskelzellen hingegen über Caveolin-3 erfolgt. Maniatis et al. (2006) fanden, dass bei der Hemmung der Endozytose der Caveolae die Aktivierung der eNOS und somit die NO-Produktion reduziert ist und vermuteten, dass eine Störung der konstitutiven Internalisierung der Caveolae in Lungenendothelien mit verminderter NO-Produktion zu Vasokonstriktion und pulmonaler Hypertonie führen könne. In glatten Gefäßmuskelzellen von Caveolin1-/- Mäusen hingegen war eine erhöhte NOS-Aktivität mit vermehrter NO-Sekretion sowie gesteigerten cGMP-Konzentrationen zu finden, was sich in starker Vasodilatation und vermindertem Muskeltonus äußerte (Drab et al. 2001).

Den Caveolae wird des Weiteren eine regulierende Eigenschaft in Bezug auf die Homöostase des freien Cholesterins in Zellen und somit der Integrität der Zellmembran zugeschrieben. Nach der Cholesterol-Aufnahme über LDL-Rezeptoren in *clathrin-coated-pits* gelangt das Cholesterol überwiegend in den Golgi-Apparat, wo bei Cholesterinüberschuss cholesterinreiche Caveolae gebildet werden, die an der Plasmamembran das Cholesterol wiederum an HDL-Partikel abgeben. Außerdem wird ein Cholesterintransport ohne Plasmavesikel, nur mittels eines Caveolin1-Chaperon-Komplexes, zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Plasmamembran diskutiert. Die Expression von Caveolin-1 wird demnach über die Menge an intrazellulärem freiem Cholesterol reguliert: Cholesterol hemmt die Spaltung des *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP), dessen Spaltprodukt SREBP-1 als Transkriptionsinhibitor von Caveolin-1 fungiert. Folglich bewirkt freies Cholesterol die Bildung von Caveolin-1 und somit seinen eigenen Efflux (Gumbleton et al. 2000, Thyberg 2002). Überraschenderweise war jedoch der Cholesterolgehalt des HDLs sowie die Lipoproteinzusammensetzung im Serum bei den Caveolin1-/- Mäusen im Vergleich zu den Wildtyptieren nicht verändert, was - ähnlich wie beim Albumintransport - einen Hinweis auf einen Kompensationsmechanismus, möglicherweise auf der Basis der erwähnten *lipid rafts*, gibt (Drab et al. 2001).

Auf mikroskopischer und somit auch morphologischer Ebene lassen sich die Caveolae verschiedener Endothelien mit Hinblick auf das Vorhandensein bzw. das Nichtvorhandensein von *Stomatal Diaphragmas* (siehe 1.5.2) als Abdeckung über der Caveolenöffnung unterscheiden. Während alle Caveolae im fenestrierten und

sinusoidalen Endothel derartige *Stomatal Diaphragmas* aufweisen, finden sich diese nur bei einem Teil der Caveolae im kontinuierlichen Endothel, so zum Beispiel in den Vasa recta der Niere, in endokrinen Drüsen, in der Zunge sowie der Lunge. In den Kapillaren des Herz- und Skelettmuskels sowie der Haut hingegen sind lediglich Caveolen ohne Diaphragmata vorhanden (Stan et al. 2004, Stan 2007).

1.3.2 Vesikulo-Vakuolare Organellen (VVO)

Als Cluster bzw. Aneinanderreihung oder Zusammenschlüsse mehrerer Caveolae werden aufgrund der augenfälligen morphologischen Ähnlichkeit oft die sog. Vesikulo-Vakuolaren Organellen (VVO) angesehen. So besitzen sowohl Caveolae als auch die einzelnen Vesikel bzw. Vakuolen der VVO Verengungen des offenen Pols (sog. *necks*), Stomata und *Stomatal Diaphragmas* als Abdeckung über den Caveolaöffnungen bzw. als Trennstruktur zwischen den Vesikeln der VVO. Bezüglich ihres Durchmessers weisen jedoch die Vesikel und Vakuolen der VVO eine größere Streuung um den Mittelwert auf als singuläre Caveolae, deren Durchmesser relativ konstant im Bereich zwischen 60-70 nm liegen. Die VVO überspannen in ihrer Ausdehnung zum Teil die gesamte Endothelzelle, sodass sie sowohl den abluminalen und luminalen Pol als auch die lateralen Zellgrenzen miteinander verbinden können. Zu finden sind VVO in Arteriolen, Kapillaren, Venolen, kleinen Venen und tumorversorgenden Gefäßen (Feng et al. 2002).



Abbildung 7: Computergestützte dreidimensionale Rekonstruktion einer die gesamte Endothelzelle durchspannenden VVO in einer Venole der Haut einer Maus. Grün: VVO, orange: Plasmamembran. An der unteren Plasmamembran ist die Öffnung zweier Vesikel in den Extrazellulärraum zu erkennen (aus Feng et al. 1996).

Laut Dvorak und Feng (2001) sind VVO als morphologisches Korrelat erhöhter zellulärer Permeabilität anzusehen, die zum einen tumorassoziiert vermittelt durch *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) in primären und metastasierten Tumorerkrankungen, zum anderen im Rahmen von akuten und chronischen, als auch allergischen Entzündungen zu finden ist. So bewirken VVO vor allem die Extravasation von größeren Molekülen, wie z.B. Plasmaproteinen.

1.3.3 Transendotheliale Kanäle (TEC)

Transendotheliale Kanäle (TEC) sind Poren mit einem Durchmesser von etwa 60-70 nm (Stan et al. 1999b), die die gesamte Endothelzelle von der abluminalen bis zur luminalen Seite durchspannen. Sie bilden sich entweder durch Fusion einer Caveola mit sowohl der abluminalen als auch der luminalen Plasmamembran oder durch die

Fusion von zwei bis vier Caveolae. Nach VEGF-Gabe beobachteten Chen et al. (2002) in HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*)-Kulturen eine Anreicherung von Caveolae sowie deren Fusion zu TEC. In fenestrierten Endothelien werden beide Öffnungen der TEC durch *Stomatal Diaphragms* bedeckt, wohingegen sich über den Kanälen im kontinuierlichen Endothel keine Diaphragmata finden lassen (Gumbleton 2000, Stan et al. 1999b, Stan 2007).

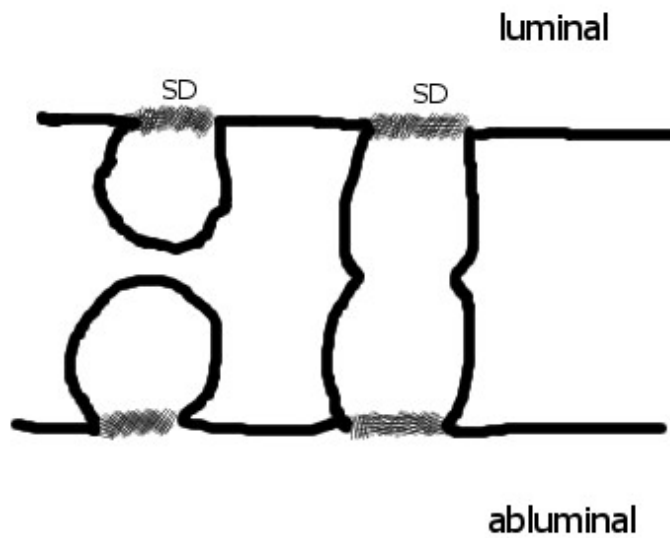


Abbildung 8: Schema der Entstehung eines TEC aus der Fusion zweier Vesikel an gegenüberliegenden Plasmamembranen. Sowohl die Caveolae als auch die Öffnungen des TEC im fenestrierten Endothel werden von *Stomatal Diaphragms* (SD) bedeckt (eigene Darstellung nach Gumbleton et al. 2000).

Während bei der Transzytose über Caveolae bestimmte Quanten bzw. Mengen an Stoffen zum Teil rezeptorvermittelt in das Interstitium transportiert werden, stellt man sich die TEC als Poren vor, die relativ unspezifisch einen kontinuierlichen Fluss entlang eines Konzentrationsgradienten zulassen. Als alleinige Transportmöglichkeit sind die TEC allerdings unwahrscheinlich, da durchaus eine gewisse Spezifität im Transport von Proteinen, wie z.B. des Albumins im Vergleich zum modifizierten Albumin, zu beobachten ist (Schnitzer 2001).

1.3.4 Fenestrae

Als namengebende Strukturen für das fenestrierte Endothel (s. 1.2.2) stellen die Fenestrae in der Aufsicht nahezu kreisrunde, in 20-30% aller Fälle auch oktogonalförmige (Apkarian 1997) Aussparungen der Endothelzellen dar. Der gemessene Durchmesser der Aussparung liegt mit hoher Regelmäßigkeit zwischen 62-68 nm (Stan 2007). In den meisten Fällen werden die Fenestrae von *Fenestral Diaphragmas* (s. 1.5.2) bedeckt, die in ihrem Aufbau sehr stark den SD über Caveolae bzw. TEC ähneln. Nicht zuletzt aufgrund dieser Tatsache wird ein enger Zusammenhang in der Biogenese dieser plasmalemmalen Strukturelemente vermutet. So lautet eine These, dass ein Fenster durch den Kollaps eines TEC entstehen könnte, welcher wiederum (s. 1.3.3) aus der Fusion von zwei bis vier Caveolen bzw. VVO hervorgegangen sei. Die Fensterbildung ist ebenso wie die Entstehung von Caveolen, VVO und TEC durch VEGF induzierbar (Chen et al. 2002). Vermeintlich kontrovers zur Hypothese der Fensterbildung aus Caveolen scheint die Tatsache, dass in Fenestrae kein Caveolin nachgewiesen werden kann. Die Arbeitsgruppe um Esser (1998) schloss aus ihren Experimenten - ebenfalls anhand VEGF-Applikation zu Endothelzellen -, dass zwei präexistente Voraussetzungen zur möglichen Fensterentstehung aus Caveolen gegeben sein müssten: So sei zum einen ein gewisser Schwellenwert an quantitativ vorhandenen Caveolae zu überschreiten, zum anderen müsse eine Extrazellulärmatrix bestimmter Zusammensetzung und somit eine geeignete dreidimensionale Struktur der Endothelzelle vorhanden sein. Dem berechtigten Einwand, dass in Fenestrae kein Caveolin nachgewiesen werden könne und diese folglich auch nicht aus Caveolen entstehen könnten, begegnen Esser et al. (1998) mit der Hypothese, dass Caveolin-1 haltige Strukturen wie Caveolen oder VVO bei ihrer Fusion zu Fenstern das Protein Caveolin-1 verlören, sodass Caveolin-1 kein Strukturprotein der Fenster darstelle.

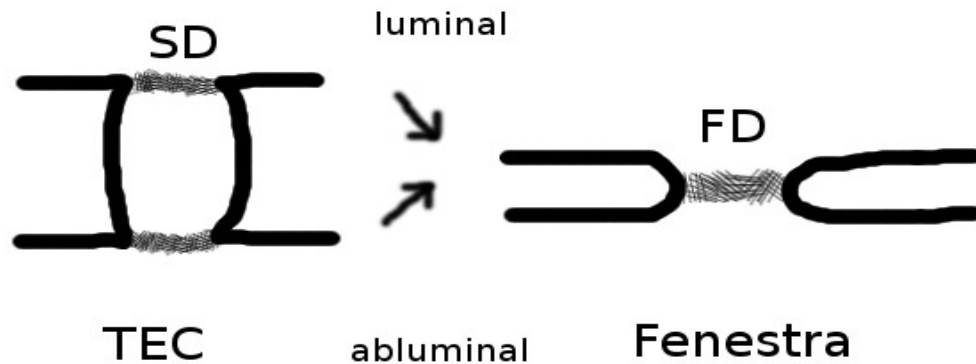


Abbildung 9: Modell des „Zusammenfallens“ eines TEC zu einem Fenster mit enormer Abflachung der Endothelzelle in diesem Bereich (eigene Darstellung nach Bildern und Inhalten von Palade und Bruns 1968, Stan 2002).

In der Rand- und Insertionszone des *Fenestral Diaphragmas* treffen der luminal und der abluminale Teil der Plasmamembran in einer stark abgeflachten Endothelzelle aufeinander. Nach spezieller Perfusion mit oxygeniertem Fluorokarbon und einer Tannin-Kontrastierung sind auf Höhe der Diaphragmata über Fenestern auch die Glykokalyx-Büschel sichtbar, die bei gängigem Fixationsprotokoll kollabieren. Die mit bis zu 0,5 μm Länge weit in das Gefäßlumen hineinragenden Fäden sind reich an Proteoglykanen mit Heparansulfatseitenketten (s. 1.5.2). Die resultierende hohe Dichte an negativen Ladungen bedingt, dass große Plasmaproteine in ähnlichem Ausmaß reflektiert werden, wie dies bei kontinuierlichen Endothelien der Fall ist. Im Gegensatz dazu können jedoch kleinere Moleküle, wie Peptidhormone, Glucose, Aminosäuren und Ionen relativ ungehindert die Endothelbarriere passieren (Drenckhahn 2004).

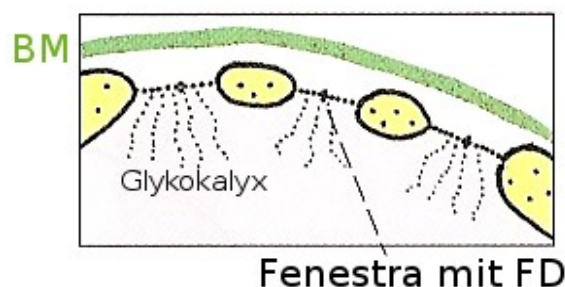


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines fenestrierten Endothels mit FD über den Fenestern sowie erkennbarer Glykokalyx (nach Drenckhahn 2004).

Als Sonderform des fenestrierten Endothels kann das Endothel in den Nierenglomeruli dahingehend angesehen werden, dass seine Fenster nicht von einem FD abgedeckt werden. Dementsprechend ist weder ein PV-1-Nachweis möglich noch sind die genannten Glykokalyx-Büschel mit Heparansulfatseitenketten erkennbar (Ballermann und Stan 2007). Ähnlich wie bei den mit FD bedeckten Fenstern finden sich aber auch bei den glomerulären Fenstern konstante Durchmesser sowie eine Anordnung in regelmäßigen Mustern innerhalb sog. „Siebplatten“. Während der embryonalen Entwicklung der Glomeruli sind noch Diaphragmata über den Fenstern zu beobachten, diese verschwinden allerdings im Zeitraum von ein bis zwei Wochen post partum (Reeves et al. 1980, Ballermann und Stan 2007).

1.4 Der Schlemm-Kanal

1.4.1 Funktion und Bedeutung des Kanals im Rahmen des Kammerwasserabflusses

Der Sinus venosus sclerae, der nach seinem Entdecker Friedrich Schlemm (1795-1859) auch Schlemm-Kanal genannt wird, liegt in der Tiefe des Sulcus sclerae und umspannt als endothel ausgekleideter leicht ovaler venöser Ring mit einem Durchmesser von 190-350 μm zirkulär das gesamte Auge (Ramos et al. 2007). Zu finden ist der Kanal beim Blick auf den sog. Kammerwinkel, also nahe des Winkels, den die Iris, die am Ziliarkörper inseriert, mit der äußeren Augenhaut in der korneoskleralen Übergangszone bildet.

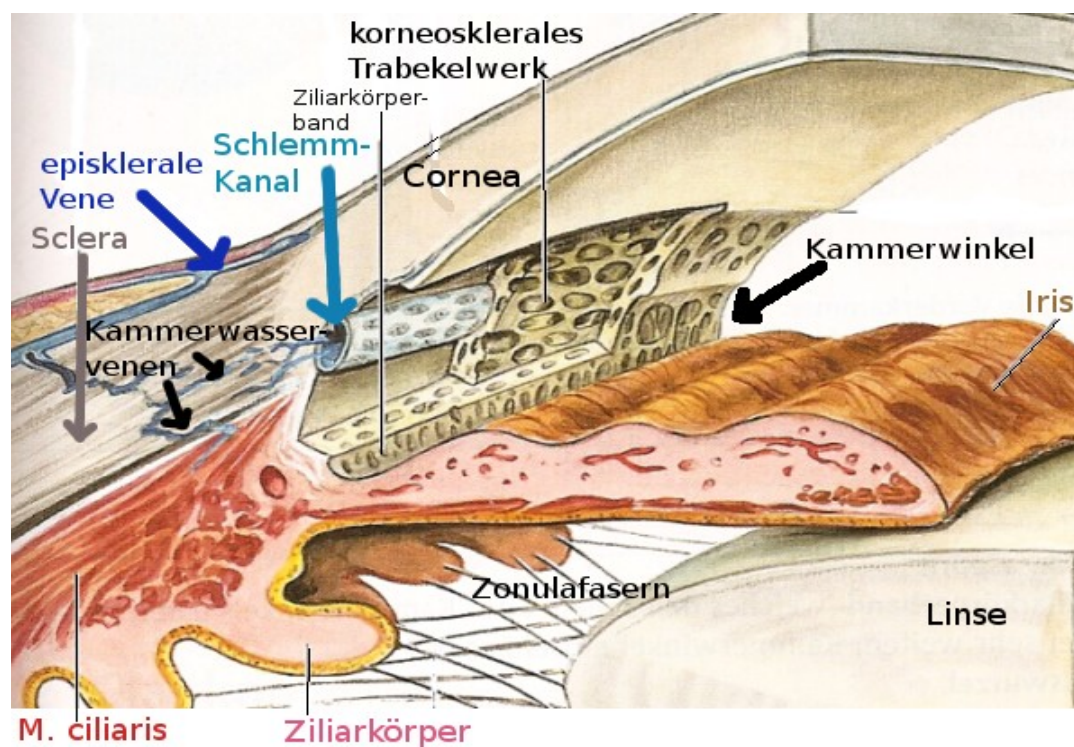


Abbildung 11: Dreidimensionale Übersichtszeichnung mit Blick auf den Kammerwinkel und die am Kammerwasserabfluss beteiligten Strukturen (modifiziert nach Sachsenweger 2003).

Die Endothelschicht des Kanals stellt die letzte Abflusshürde des Kammerwassers dar, bevor die Resorption in eine Vene und damit in den Körperkreislauf erfolgt. Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene Abflusswege, der trabekuläre sowie der uveosklerale, unterscheiden:

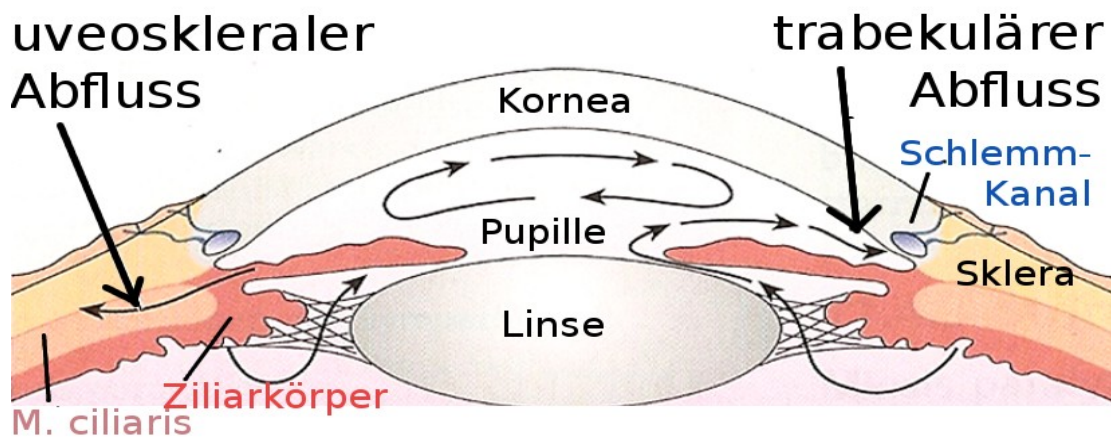


Abbildung 12: Weg des Kammerwassers durch das Auge: Nach Produktion durch die Ziliarkörperzotten in der hinteren Augenkammer gelangt das Kammerwasser über die Pupille in die vordere Augenkammer, wo es auf trabekulärem oder uveoskleralem Weg abfließt (modifiziert nach Sachsenweger 2003).

Nachdem das Kammerwasser durch das zweischichtige Ziliarepithel mit einer Rate von etwa 0,15 ml/h sezerniert wird, gelangt es an Linse und Iris vorbei über die Pupille in die vordere Augenkammer. Hier wird es unter physiologischen Bedingungen zu mehr als 90% über den trabekulären Weg abgeleitet, indem es zunächst die ein bis drei netzartig aufgeweiteten Zelllagen des uvealen, im Anschluss die Zelllagen des korneoskleralen Trabekelwerks über interzelluläre Öffnungen passiert (Sachsenweger 2003). Unmittelbar vor der inneren Wand des Schlemm-Kanals liegt eine Region losen Bindegewebes mit Zellen, die nur gering und relativ ungeordnet untereinander sowie über Kollagen- bzw. Elastinfasern mit der inneren Wand des Schlemm-Kanals verbunden sind. Diese juxtakanalikuläre oder auch kribriforme Region steht zusammen mit dem Schlemm-Kanal im Verdacht, einen Großteil des intraokulären Druckes zu generieren (s. 1.4.3) (Bill und Mäepea 1994). Nach dem Eintritt in den Schlemm-Kanal (s. 1.4.2) gelangt das Kammerwasser über die Kammerwasservenen und Sammelkanäle schließlich in episklerale Venenplexus und damit in den Körperkreislauf zurück. Eine untergeordnete Rolle beim Kammerwasserabfluss unter physiologischen Bedingungen spielt der uveosklerale Abfluss, bei dem weniger als 10% des Kammerwassers nach kurzer Passage der

anterioren Oberfläche des Ziliarkörpers oder einiger Trabekelwerkslagen zwischen den Interstitialräumen der Ziliarmuskelbündel hindurch in die Uvea und schließlich über den supraciliären Raum in die Sklera gelangen, um dann in intra- bzw. episklerale Gefäße einzusickern (Sachsenweger 2003). An Bedeutung gewinnt der uveosklerale Abflussweg bei der Behandlung eines Offenwinkelglaukoms, da Prostaglandine wie Latano- oder Travoprost wohl zum einen eine Relaxation des Ziliarmuskels bewirken können, zum anderen die Interzellularräume des Bindegewebes aufweiten und somit den Abfluss des Kammerwassers erleichtern (Bill und Mäepea 1994).

1.4.2 Ultrastruktur des Kanalendothels: *Giant Vacuoles* und transzelluläre Poren

Im Laufe der Rückführung des Kammerwassers in die systemische Zirkulation stellt die innere Wand des Schlemm-Kanals die letzte Barriere dar, die dadurch einem beträchtlichen mechanischen Stress, der - völlig untypisch für Endothelbarrieren - von basal nach apikal wirkt, ausgesetzt ist. Das kontinuierlich über den Endothelzellen bestehende Druckgefälle bewirkt, dass diese von ihrer Grundlage, der Basalmembran abgehoben werden. Dieses Druckgefälle kann abgeschätzt werden, wenn man die Differenz zwischen intraokulärem Druck (Normbereich zwischen 10-21 mmHg) und dem Druck innerhalb des Schlemm-Kanals kalkuliert. Dieser mechanischen Beanspruchung trägt die Morphologie der Endothelzellen sowie ihrer Basalmembran Rechnung (Inomata et al. 1972).

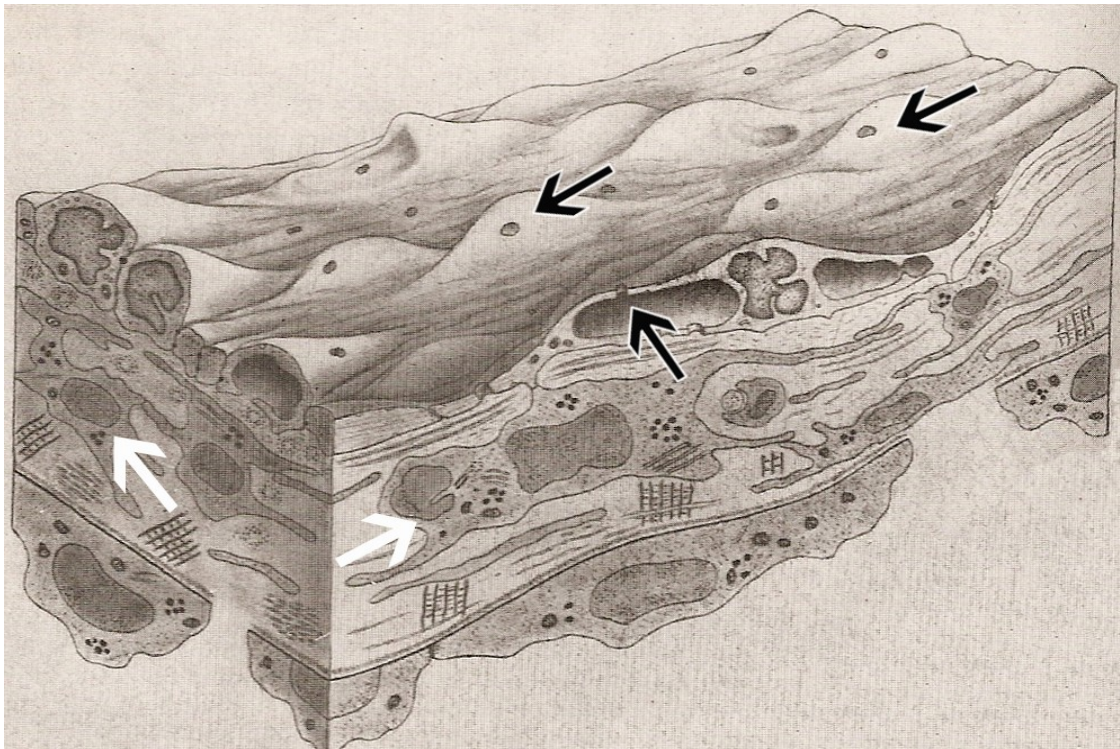


Abbildung 13: Dreidimensionale Schemazeichnung des Endothels der inneren Wand des Schlemm-Kanals mit den angrenzenden Zellschichten des Trabekelwerks. Deutlich zu erkennen sind die charakteristischen Vorwölbungen der Endothelzellen, die aufgrund des wirkenden Druckgefälles über der inneren Wand des Schlemm-Kanals von ihrer Basalmembran abgehoben werden. Während die schwarzen Pfeile auf die Poren am luminalen Pol der *Giant Vacuole* zeigen, markieren die weißen Pfeile Zellkerne der unterliegenden Trabekelwerkszellen (nach Inomata et al. 1972).

Charakteristischerweise zeichnen sich die Endothelzellen durch das Vorhandensein sog. *Giant Vacuoles* (GV) aus, deren Maße im Schnittbild etwa 5 μm in der Weite und bis zu 25 μm in der Länge betragen können (Bron et al. 1997) und die sich nur unidirektional, also bei Perfusion von basal nach apikal formieren. Somit bilden diese *Giant Vacuoles* das strukturelle Korrelat eines Einwegklappenmechanismus, der verhindert, dass bei Erhöhung des intravenösen Druckes im Schlemm-Kanal retrograd Blut über die Endothelbarriere in das Augeninnere vordringen kann (Alvarado 2004). Diese Riesenvakuolen stellen aber nicht - wie der Name vermuten lassen könnte - intrazelluläre Einstülpungen eines Plasmamembranabschnittes dar, sondern beschreiben vielmehr großblasige Ausstülpungen der gesamten, enorm abgeflachten Endothelzelle, die aufgrund des transendothelialen Druckes von ihrer Basalmembran abgehoben wurde. An der Basis der Ausstülpung, also auf dem

Niveau der Basalmembran, entstehen in der Folge der Abhebung Öffnungen, die aufgrund der darunterliegenden Lücken in der diskontinuierlichen Basalmembran in unmittelbaren Kontakt zum juxtakanalikulären Bindegewebe treten können. Die Durchmesser dieser basalen Öffnungen betragen etwa 2,5-3,5 μm (Inomata et al. 1972).

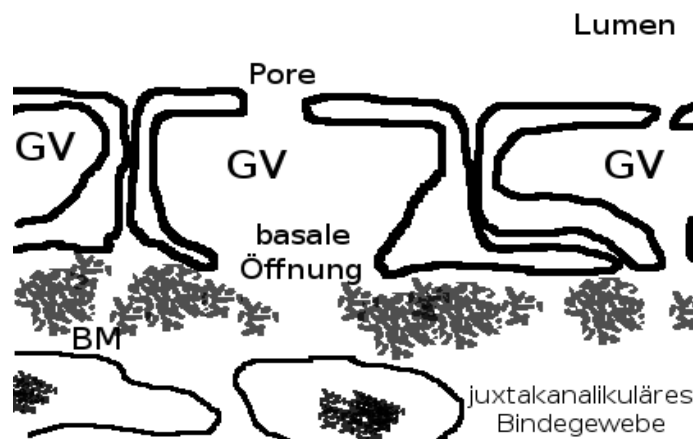


Abbildung 14: Schemazeichnung eines Ausschnittes der inneren Wand des Schlemm-Kanals mit *Giant Vacuoles* (GV), diskontinuierlicher Basalmembran (BM) und darunterliegendem juxtakanalikulärem Bindegewebe (eigene Schemazeichnung nach Bildern von Inomata et al. 1972).

Ein Teil der GV, nach rasterelektronenmikroskopischer Auswertung etwa 13-29%, kann darüberhinaus aufgrund luminaler Poren auch noch mit dem Lumen des Schlemm-Kanals kommunizieren (Johnson und Erickson 2000). Diese Poren mit einem mittleren Durchmesser von 1 μm (Johnson 2006) und einer Streuung von 0,1-2,0 μm (Bill und Mäepea 1994) bilden sich an extrem ausgedünnten Zellabschnitten durch Fusion der apikalen mit der basalen Zellmembran, sodass sich hier die Frage aufwirft, ob die Biogenese der luminalen Poren über die Transformation von Caveolen zu TEC und eventuell Fenstern stattfinden könnte, aus welchen durch mechanische Zerreißung der *Fenestral Diaphragmas* bei Perfusion dann Poren entstehen (Bill und Mäepea 1994).

Die Bildung sowohl der GV als auch der Poren ist von bestimmten Variablen abhängig: GV zeigen eine sehr schnelle Reaktion auf sich verändernde intraokuläre Druckwerte, indem sich ihre Dichte und ihre Größe in linearem Zusammenhang zu steigenden Druckwerten erhöhen; entsprechend verschwinden die GV größtenteils innerhalb von drei Minuten, wenn der intraokuläre Druck auf 0 mmHg gesenkt wird (Brilakis und Johnson 2001). Ebenso druckabhängig ist auch der Durchmesser der basalen Öffnung. Aufgrund der beiden letztgenannten Beobachtungen wird die Bildung der Riesenvakuolen meist als passiver druckabhängiger Prozess interpretiert (Ethier 2002).

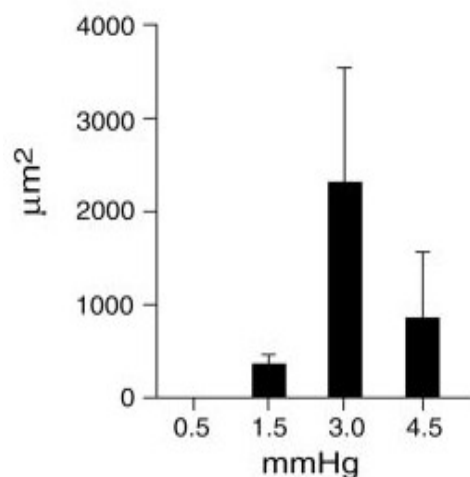


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen dem transendothelialen Druck in mmHg und der Fläche an gebildeten GV bei Perfusion einer Zellschicht aus menschlichen Schlemm-Kanal-Endothelzellen. Der Abfall bei 4,5 mmHg ist auf das Zerreißen der Endothelschicht zurückzuführen (aus Alvarado 2004).

Im Gegensatz zur Druckabhängigkeit der GV-Bildung scheint die Porenbildung innerhalb der GV in positiver Weise mit dem Volumen des verwendeten Fixans, das durch den Kammerwasserabflussweg perfundiert wird, zu korrelieren, was den Verdacht auf eine Artefaktbildung nahe legt. Untypisch für eine rein artifizielle Bildung der Poren ist jedoch eine Abnahme der Porendichte bei Zunahme der post-mortem-Zeitspanne, die bis zum Beginn der Fixation vergeht. Johnson (2006) findet für dieses Problem eine mögliche Erklärung: Er geht davon aus, dass der Fixierungsvorgang unter Flussbedingungen mechanischen Stress auf die innere Wand

des Schlemm-Kanals ausübt; zum einen bedingt durch druckabhängige Dehnung der Wand, zum anderen durch Gewebeschrumpfung aufgrund des Fixierungsvorgangs. Diejenigen Poren, die aufgrund des druckabhängigen Stresses entstünden, entsprächen demnach den auch in physiologischen Umständen vorhandenen Poren, während diejenigen, die aufgrund der Gewebeschrumpfung vermehrten Stress auf die Endothelzellen ausübten, als artifizielle Poren fixationsvolumenabhängig aufträten. In diesem Zusammenhang drängt sich die Frage auf, auf welchem Weg der bei der Fixation entstehende mechanische Stress zur Porenbildung führt. Der molekulare Mechanismus, der im Rahmen der Porenbildung in der Endothelzelle eine derartig eminente Veränderung der Zellmorphologie bewirkt, ist bislang noch völlig ungeklärt. Somit fehlt auch ein Marker, der qualitative oder quantitative Aussagen über die Porenbildung zulassen würde und über dessen Knockdown man detailliertere Erkenntnisse über den genauen Ablauf der Porenentstehung gewinnen könnte. Bekannt ist dahingehend nur, dass als Voraussetzung für die Entstehung der Poren lokalisiert eine enorme Abflachung innerhalb der Endothelzelle vorhanden sein muss, um eine Annäherung der basalen mit der apikalen Zellmembran und schließlich ihre Fusion zu ermöglichen. In ähnlicher Art und Weise muss die Endothelzelle auch im Rahmen der Fensterbildung (s. 1.3.4) abgeflacht sein, was einen Hinweis auf einen biogenetischen Zusammenhang bieten könnte. Daher wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit einer mechanisch bedingten Transformation oder auch Zerreißung vorhandener diaphragmenbedeckter TEC oder Fenster mit dem Ergebnis der Porenentstehung angedacht (s. 1.6). Eine im Zusammenhang mit der genannten Überlegung äußerst interessante Arbeit stammt von der Arbeitsgruppe um Inomata, die 1972 in ihrer Untersuchung der Poren in der inneren Wand des Schlemm-Kanals von Cynomolgus-Affen einmalig über eine „porenähnliche“ Struktur, eine sogenannte „Minipore“, die von einem Diaphragma bedeckt wird, berichten. Dieselbe Arbeitsgruppe beobachtete bei Erhöhen des Druckgradienten über der inneren Wand des Schlemm-Kanals auch ein Zerreißen dieser Diaphragmata über den erwähnten „Miniporen“ und lieferten damit einen ersten möglichen Hinweis auf den Mechanismus der Porenentstehung.

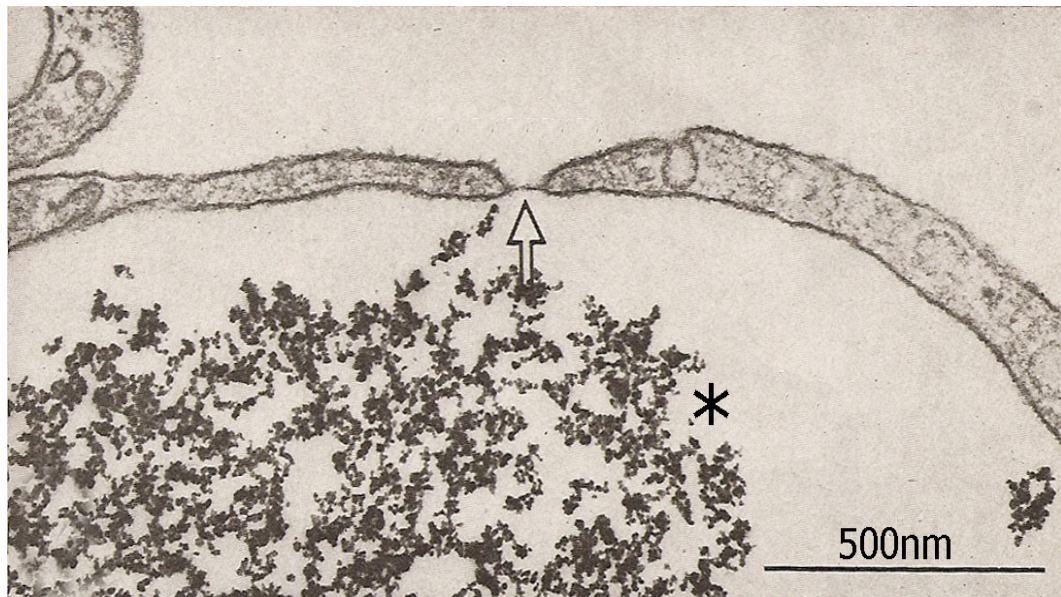


Abbildung 16: Einmalige Beschreibung einer von einem Diaphragma bedeckten „porenähnlichen“ Struktur (Durchmesser 0,06 µm) in der inneren Wand des Schlemm-Kanals eines Cynomolgus-Affen (weißer Pfeil); innerhalb der *Giant Vacuole* sind die perfundierten Thorotrast-Partikel (*) zu erkennen (modifiziert nach Inomata et al. 1972).

Die Beschreibung dieser fenesterähnlichen Struktur, deren Durchmesser von Inomata et al. mit 60 nm angegeben wird, überschneidet sich überraschend treffend mit den weiter oben beschriebenen *Fenestral Diaphragmas*. Da diese Beobachtung nur singulär für den Schlemm-Kanal von Cynomolgus-Affen getroffen wurde, interessiert, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß sich diese *Fenestral Diaphragmas* auch in anderen Spezies, wie z.B. der Maus, finden lassen und ob diese Fenster ursächlich an der Entstehung der Poren in den *Giant Vacuoles* und damit dem Kammerwasserabfluss beteiligt sind.

Trotz der großen Menge an Flüssigkeit und Stoffen, die die Endothelschicht des Schlemm-Kanals überwinden, exprimieren die Endothelzellen viele Zonulae occludentes enthaltende Schlussleistennetze (Alvarado 2004). In vergleichbaren Gefäßen mit einer Perfusionsrichtung von basal nach apikal, wie zum Beispiel postkapillären Venolen oder Lymphgefäßen, findet man hingegen große interzelluläre Lücken (Ramos et al. 2007). Ob auch im Endothel des Schlemm-Kanals parazellulärer

Fluss vorhanden ist, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Während Epstein und Rohen (1991) bei Perfusionsversuchen mit kationisiertem Ferritin einen durchaus ausgeprägten parazellulären Fluss beobachteten, für den Ethier et al. (1998) mit ihrer Beschreibung sogenannter *border pores* an den Zell-Zell-Grenzen eine passende morphologische Erklärung liefern, finden andere Arbeitsgruppen (Inomata et al. 1972, Johnson 2006) keinen oder keinen bedeutsamen parazellulären Übertritt von Kammerwasser. Gegen eine signifikante Beteiligung des parazellulären Flusses am Kammerwasserübertritt in den Schlemm-Kanal sprechen allerdings die hohe Leitfähigkeit der inneren Wand sowie der ungehinderte Übertritt von Mikropartikeln mit einer Größe bis zu 500nm, sodass von einer zu vernachlässigenden Bedeutung des parazellulären Weges ausgegangen werden kann (Johnson 2006). Rückblickend lässt sich also das Endothel des Schlemm-Kanals mit diskontinuierlicher Basalmembran, aber erhaltenen Interzellularkontakten, sowie perfusionsdruckabhängigen *Giant Vacoules* und flussvolumenabhängigen Poren nicht uneingeschränkt dem diskontinuierlichen Endothel zuordnen, sondern sollte als Sonderfall angesehen und folglich als transient perforiertes diskontinuierliches Endothel bezeichnet werden (Drenckhahn 2004).

1.4.3 Lokalisation des Kammerwasserabflusswiderstands: Relevanz des Schlemm-Kanals

Seitdem bekannt ist, dass die Entstehung eines Glaukoms an einen für das jeweilige Auge zu hohen intraokulären Druck gekoppelt ist, sucht man nach der Region im Abflussweg des Kammerwassers, die sowohl für die Entstehung eines physiologischen als auch des pathologisch erhöhten Abflusswiderstandes verantwortlich sein könnte. Während Seidel 1921 noch vorwiegend morphologisch beschreibend anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen Hinweise zu finden suchte, verlagerte sich der Schwerpunkt später auf elektronenmikroskopische Untersuchungen und mathematisch-physikalische Auswertungen von Abflussmodellen (Bill und Svedbergh 1972, Johnson et al. 1992).

Einen eher vernachlässigbar kleinen Widerstand erzeugt die Region des uvealen sowie des korneoskleralen Trabekelwerks, da die Öffnungen zwischen den Trabekelwerkslammellen im uvealen Abschnitt 25-75 μm , im korneoskleralen

Abschnitt immer noch 2-15 μm groß sind, sodass diese Region als hochporös angesehen und nicht als widerstandsbestimmend eingeordnet wird (Johnson 2006). Diese Ansicht unterstützen Versuche an Augen, bei denen man in innere Schichten des Trabekelwerks schnitt, anschließend aber keine Veränderungen im Abflusswiderstand festzustellen waren (Grant 1963).

Etwas mehr Verdacht in Bezug auf die Generierung eines Widerstands zieht das juxtakanalikuläre Bindegewebe auf sich. Zwar sind die ortsständigen Bindegewebszellen nur lose untereinander, mit der fibrillären Extrazellulärmatrix sowie mit den Endothelzellen des Schlemm-Kanals verbunden und bewirken dadurch unter Perfusionsbedingungen eine hohe Porösität mit annähernd 40% freien Räumen (Ten Hulzen und Johnson 1996), doch liegt die Vermutung nahe, dass die extrazelluläre Substanz, die sich mit gewöhnlichen transmissions-elektronenmikroskopischen Verfahren nur unzureichend konservieren und beurteilen lässt, einen erheblichen Widerstand generieren kann. Für diese Vermutung ursächlich sind Widerstandsmessungen nach Andauung des untersuchten Gewebes mit bestimmten Proteinase. So konnte am menschlichen Auge nach Matrixmetalloproteinaseandauung des juxtakanalikulären Bindegewebes ein verminderter Abflusswiderstand gemessen werden (Bradley et al. 1998), ebenso nach einer Andauung von Augen verschiedener Spezies mittels Glykosaminoglykanasen (GAGasen). Dies legt nahe, dass Proteine der Extrazellulärmatrix im juxtakanalikulären Bindegewebe einen Teil des Widerstandes erzeugen (Johnson 2006).

Des Weiteren erscheint die unter dem Endothel des Schlemm-Kanals liegende diskontinuierliche Basalmembran aufgrund ihrer vorhandenen Lücken als Ort der Widerstandserzeugung eher ausgeschlossen (Gong et al. 2002). Jedoch ist bisher nicht klar, ob und wenn ja in welchem Ausmaß die Öffnungen in der diskontinuierlichen Basalmembran auch an der Generierung des weiter unten erklärten *funneling*-, also „Trichtereffektes“ beteiligt sind.

Auch die innere Wand des Schlemm-Kanals an sich zeigt in Messungen ihrer hydraulischen Leitfähigkeit (Permeabilität), also der Leitfähigkeit bezogen auf eine Oberfläche, ähnlich hohe Werte wie sie sonst nur bei fenestrierten Endothelien

beobachtet werden (Bill und Svedbergh 1972). Damit könnte die innere Wand für maximal 10% der Abflusswiderstandes verantwortlich sein. In scheinbar scharfem Kontrast dazu stehen Ergebnisse von Widerstandsmessungen nach Zerreißung der inneren Wand durch Andauung oder Chelatbildner (Hamanka und Bill 1987), die einen weitaus höheren Widerstandsverlust abschätzen ließen als dies nach den vorgenannten Leitfähigkeitsmessungen der Fall sein dürfte. Die ermittelten Einzelwiderstände über den jeweiligen, getrennt voneinander betrachteten Schichten (Endothel der inneren Wand des Schlemm-Kanals, Basalmembran, juxtakanalikuläres Bindegewebe) fallen in ihrer Summe also kleiner aus als der über alle diese Schichten nachweisbare Gesamtwiderstand (Overby et al. 2009). Für dieses Paradoxon schlägt Johnson (1992) eine Lösung im Sinne einer hydrodynamischen Interaktion zwischen innerer Wand und juxtakanalikulärem Bindegewebe vor, deren wesentliches morphologisches Korrelat mechanisch stabilisierende Verbindungsstränge zwischen der inneren Wand und dem juxtakanalikulären Bindegewebe sind: Im Rahmen des sog. *funnelling*-, also „Trichtereffektes“, zwingen die Poren der inneren Wand des Schlemm-Kanals aufgrund der vorhandenen Gewebestränge die Flüssigkeit beim Durchtreten des juxtakanalikulären Bindegewebes einem auf die Poren zulaufenden Trichter zu folgen, wodurch sich die effektive Fläche, die für den Fluss des Kammerwassers durch das juxtakanalikuläre Gewebe zur Verfügung steht, auf die „Trichterfläche“ vermindert und der dort erzeugte Abflusswiderstand vergrößert wird. Dadurch fällt zwar unmittelbar über der Endothelschicht des Schlemm-Kanals weniger Druck ab, jedoch haben die Poren in der inneren Wand des Schlemm-Kanals durch Generierung des *funnelling*-Effektes eine gravierende Auswirkung auf die Höhe des Abflusswiderstandes.

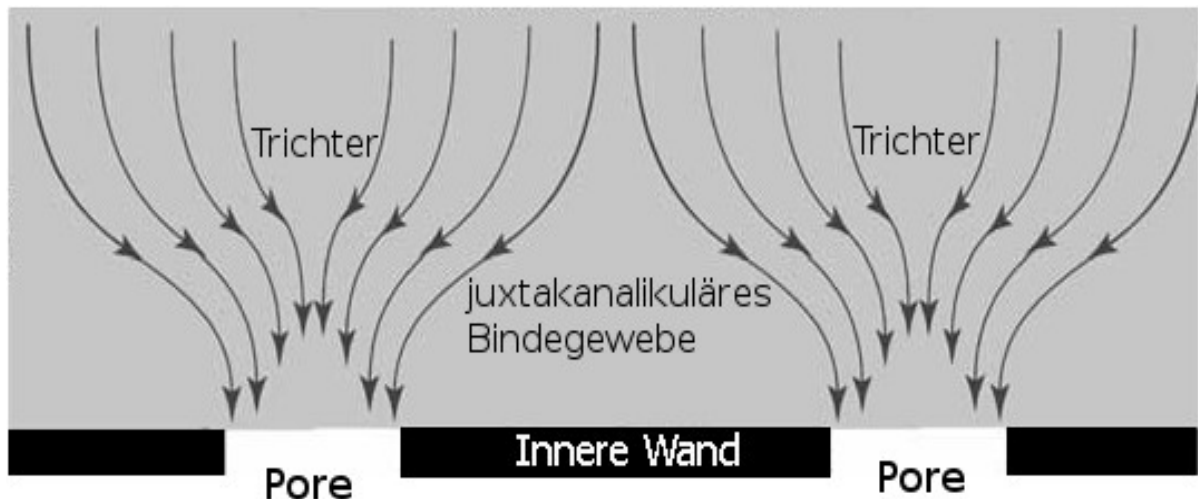


Abbildung 17: Schema des sog. *funnelling*- oder auch „Trichtereffektes“, nach dem die Poren in der inneren Wand des Schlemm-Kanals die Bündelung des Kammerwasserflusses im juxtakanalikulären Bindegewebe bewirken. Dadurch wird die reale Abflussfläche verkleinert, der Widerstand erhöht (modifiziert nach Johnson 2006).

Aufgrund des Trichtereffektes könne die Größe und Dichte der Poren einen erheblichen Effekt auf die Permeabilität des Bindegewebes ausüben. Nach diesem Modell entstehe der Großteil des Widerstandes im juxtakanalikulären Bindegewebe, die Porendichte und -größe sei aber ein wichtiger Regulationsfaktor des Widerstandes.

Dadurch lässt sich auch erklären, warum bei artifizieller Relaxation der erwähnten Verbindungsstränge zwischen innerer Wand und juxtakanalikulärem Bindegewebe durch den Proteinkinaseinhibitor H-7 (1-[5-Isoquinoliny]-sulfonyl]-2-methylpiperazin) der *funnelling*-Effekt minimiert wird: Bei schwächer ausgeprägter mechanischer Verbindung sind die Poren in der inneren Wand des Schlemm-Kanals nur noch in geringerem Ausmaß in der Lage, die Trichterbildung des Kammerwassers beim Fluss durch das juxtakanalikuläre Bindegewebe zu induzieren, wodurch der Abflusswiderstand enorm abnimmt (Sabanay et al. 2000).

Im Rahmen dieser Überlegungen verwundert es nicht, dass Johnson et al. (2002) bei Perfusionsversuchen von Glaukomentpatienten eine um den Faktor 5 verminderte Anzahl an Poren in der inneren Wand des Schlemm-Kanals im Vergleich zu

nichtglaukomatösen Spenderaugen fanden. Da allerdings - wie in 1.4.2 diskutiert - die Porenbildung zum Teil als Artefakt auftritt, wird die Bewertung und Einordnung der Wichtigkeit des *funneling*-Effektes für die Lokalisation des Widerstandes enorm erschwert. Des Weiteren ist bislang noch ungeklärt, ob nicht auch die Öffnungen innerhalb der diskontinuierlichen Basalmembran, die der inneren Wand des Schlemm-Kanals untergelagert ist, einen gewissen Trichtereffekt auf das abfließende Kammerwasser ausüben können (Overby et al. 2009).

1.4.4 Unterschiede zwischen innerer und äußerer Wand des Kanals

Bei der Erforschung des Schlemm-Kanals ist fast ausnahmslos die innere Wand im Zentrum des Interesses. Doch auch über die äußere, also die der Sklera zugewandte Wand des Kanals scheint ein Transport des Kammerwassers zu erfolgen, wenn Kammerwasser in die Sklera sickert und von dort über die Endothelbarriere abgeleitet wird. Im Vergleich mit der inneren Wand finden sich im Endothel der äußeren Wand weniger Riesenvakuolen sowie eine dickere und weniger poröse Basalmembran (Bron et al. 1997).

1.5 Das Protein PV-1

1.5.1 Aufbau und Struktur

Der Name PV-1 steht in seiner Abkürzung für das Protein *Plasmalemmal Vesicle Associated Protein-1*, das *Plasmalemmal Vesicles*, Plasmamembraneinstülpungen, die auch Caveolae genannt werden, auszeichnet und vom PLVAP (*Plasmalemmal Vesicle Associated Protein*)-Gen codiert wird. Der erste Nachweis dieses Proteins gelang Stan et al. (1999a) in strenger Koloalisation mit Caveolin bei der Untersuchung von Endothelien der Rattenlunge, im Besonderen ihrer Caveolae. Bei PV-1 handelt es sich um ein integrales Membran-Glykoprotein mit einer Größe von etwa 50 kDa in der nicht posttranslational modifizierten Form, von etwa 60 kDa in der N-glykosilierten modifizierten Variante. Es besitzt eine sehr kurze intrazelluläre Domäne, die den N-Terminus enthält, eine Transmembran-Domäne zwischen den Aminosäuren 25-50 sowie eine lange extrazelluläre Domäne mit dem C-Terminus, aufgrund dieser Eigenschaften gehört es also zu den TypII-Membranproteinen. Die extrazelluläre Domäne enthält neben einer Prolin-reichen Region zwei große *coiled-coil*-Domänen

1 Einleitung

mit α -helikaler Sekundärstruktur, in denen jede siebte Aminosäure hydrophober Natur ist (Stan 2007).

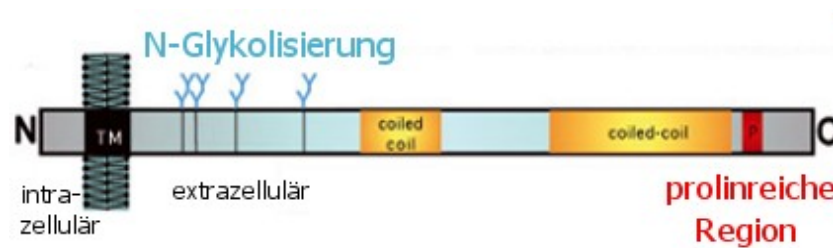


Abbildung 18: Schema der Membranverankerung und der Struktur des PV-1-Monomers. TM=Transmembrandomäne (nach Stan 2007).

Daraus ergibt sich eine hydrophobe Oberfläche, über die ein Monomer mit der entsprechenden hydrophoben α -helikalen *coiled-coil*-Domäne eines weiteren Monomers in Kontakt treten und eine Dimerbildung in vivo bewirken kann. Da innerhalb der extrazellulären Domäne außerdem jede neunte Aminosäure ein Cystein darstellt und sich sieben jener Cysteine innerhalb der *coiled-coil*-Domäne befinden, liegt eine Stabilisierung dieser intermolekularen Wechselwirkung über Disulfidbrücken sehr nahe. Die Interaktion zwischen benachbarten Dimeren dürfte jedoch nicht-kovalenter Natur sein, da sich in SDS die Solubilisierung von PV-1-Dimeren beobachten lässt (Stan 2007).

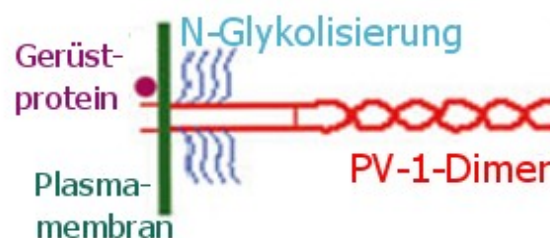


Abbildung 19: Modell des PV-1-Dimers mit Verankerung in der Plasmamembran (nach Stan 2007)

Um sich der Bedeutung des PV-1 in der Bildung von FD und SD bewusst zu werden, bedienten sich Stan et al. (2004) und Ioannidou et al. (2006) einiger Zellversuche mit Knockdown bzw. Transfektion von markiertem PV-1. Bei Ausschalten der PV-1-

mRNA mittels siRNA und Downregulation des PV-1-Protein um mehr als 95% wurde keine Bildung von Diaphragmata mehr beobachtet. Während darüberhinaus bei Stan et al. (2004) auch die Bildung von TEC und Fenstern als Ganzes sistierte, fand die Arbeitsgruppe um Ioannidou (2006) nach der siRNA-Behandlung von Endothelzellen die Fenster in lediglich gering verminderter Anzahl, jedoch war ihre Struktur stark gestört: So streute der Abstand der einzelnen Fenster untereinander innerhalb einer „Siebplatte“ stärker um den Mittelwert; auch hatten die einzelnen Fenster, denen nun ein FD als Abdeckung fehlte, größere Durchmesser mit einer erhöhten Standardabweichung. Daher, so postulierte die Arbeitsgruppe, seien die FD in der Morphogenese der Fenster wichtig, um den Durchmesser der Fenster und deren Anordnung innerhalb einer „Siebplatte“ festzulegen.

Das Einbringen von PV-1 hingegen führte bei Stan et al. (2004) sowohl in endothelialen als auch in nicht-endothelialen Zellen zur Bildung von SD über Caveolae, selbst wenn die Zellen *in situ* keine PV-1-Expression aufwiesen. Die Tatsache, dass lediglich die Bildung von SD über Caveolen beobachtet werden konnte, liege laut Stan (2004) daran, dass andere Ultrastrukturen der Plasmamembran, wie z.B. TEC oder Fenster, nicht präexistent in den untersuchten Zellen gewesen seien und sich somit auch keine SD über TEC bzw. FD über Fenster bilden könnten. PV-1 sei also notwendig, aber nicht ausreichend für die Bildung von TEC und Fenstern, jedoch notwendig und ausreichend für die Bildung von SD und FD. Die Behandlung von Endothelzellen in der Kultur mit *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) führte zu einer Hochregulation von PV-1, einer Ausbildung von SD über Caveolen sowie zu einer Neubildung von TEC mit SD und Fenstern mit FD. Diese Ergebnisse geben einen weiteren Hinweis auf den starken Zusammenhang in der Morphogenese der genannten Strukturen (Stan et al. 2004).

1.5.2 Lokalisation in *Fenestral Diaphragmas* und *Stomatal Diaphragmas*

Anhand der Ergebnisse, die über die Ultrastruktur der Proteins PV-1 und seine Membranverankerung gewonnen wurden, entwickelte Stan (2007) ein Arbeitsmodell, das erklären soll, auf welche Art und Weise und in welcher Anordnung PV-1-Dimere Diaphragmata bilden können. Beiden Subtypen an Diaphragmata, also den *Fenestral*

ebenso wie den *Stomatal Diaphragmas*, scheint trotz kleinerer Unterschiede der grundsätzliche Aufbau gemeinsam zu sein:

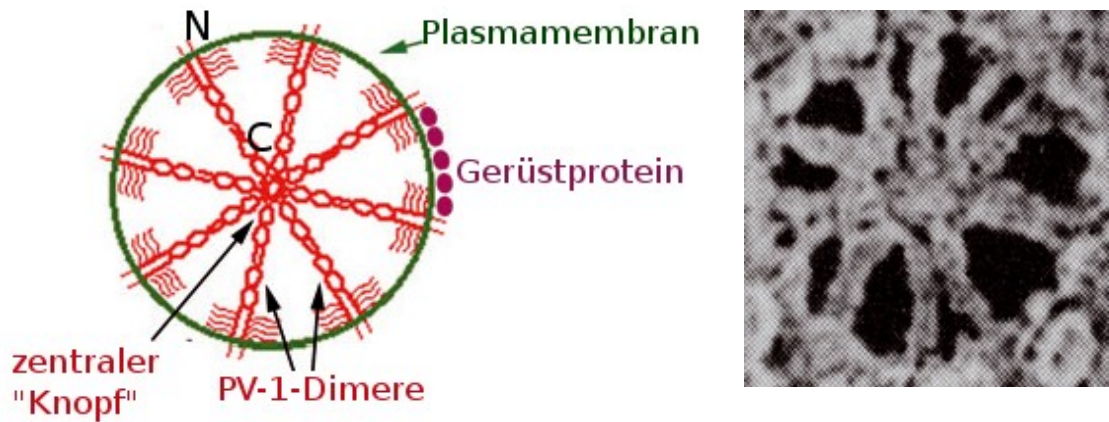


Abbildung 20: Links das Arbeitsmodell einer Aufsicht auf ein Diaphragma bestehend aus acht PV-1-Dimeren, die mit dem N-Terminus in der Plasmamembran verankert sind und sich mit ihren C-Termini im Zentrum zu einem „Knopf“ vereinigen. Rechts zum Vergleich eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines *Fenestral Diaphragmas* in der Aufsicht (nach Stan 2007).

In der Aufsicht weist das Diaphragma Ähnlichkeit mit einer Radspeiche auf, wobei die PV-1-Dimere als einzelne Speichen mit ihren N-Termini in der zirkulär „ausgeschnittenen“ Plasmamembran verankert sind und sich im Zentrum des Rades mit ihren C-Termini zu einem „Knopf“ bzw. einem „Knubbel“ vereinigen. Die Stabilisierung des Diaphragmas könnte über eine Interaktion der C-Termini der PV-1-Dimere untereinander oder über einen Kontakt der PV-1-Dimere zu Zytoskelettbestandteilen zustande kommen (Stan 2007).

Unterschiede zeigen die beiden Subtypen vor allem in Bezug auf ihre Ladungen und somit ihre Bindungsfähigkeiten von geladenen Molekülen. Während FD aufgrund zahlreicher negativ geladener Heparansulfatproteoglykane (HSPG) in ihren Glykokalyxbüscheln keine bzw. nur sehr wenige Lektine binden, weisen SD keine anionischen Abschnitte, wie z.B. HSPG, auf und binden Lektine daher sehr gut. Bei den SD geht Stan davon aus, dass das PV-1-Rückgrat wegen seines basischen pI unter physiologischem pH-Wert positiv geladen ist und somit Lektine binden kann. Da Caveolae mit ihren SD allerdings sehr wandelbare und daher oft kurzlebige

Strukturen darstellten (s. 1.3.1-1.3.4), reiche ihre Überlebenszeit nicht aus, um aufgrund von Filtrationsprozessen zirkulierende HSPG zu binden. Auf den FD von Fenstern, die als räumlich und zeitlich stabil gelten, könnten sich leichter HSPG ablagern (Stan 2007).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Vorhandensein von PV-1 im Endothel des Schlemm-Kanals am Mausauge zu prüfen. Im Rahmen des immunhistochemischen Nachweises sollte der Antikörper panECA (MECA-32) auf seine Eignung zur Antigenerkennung im Mausauge getestet werden. Bei der Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen interessiert, ob die lediglich von Inomata et al. (1972) anekdotisch im Affenauge erwähnten Miniporen mit Diaphragmenbedeckung auch im Schlemm-Kanal des Mausauges gefunden und eventuell als Fenster mit *Fenestral Diaphragmas* identifiziert werden können. Zu diesem Zweck sollte zunächst ein Protokoll mit geeigneten Fixationslösungen und Einbettmodalitäten erarbeitet werden, unter dem sowohl eine gute Strukturhaltung des Gewebes als auch eine spezifische Antigenerkennung durch den Antikörper panECA (MECA-32) gewährleistet ist.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Bleicitrat	Leica, Bensheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
CWFS-Gelatine (40%)	Aurion, Wageningen, Niederlande
DDSA (Dodecenylderivateinsäureanhydrid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycidether	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Goat-Serum	Dako, Glostrup, Dänemark
Heparin-Natrium 25.000 I.E./5 ml	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 10%	WDT, Garbsen
Lysin-HCl	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Methoxyethylacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MNA (Methylnadic Anhydride)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumazid NaN_3	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natrium-m-periodat	Sigma, St. Louis, USA
Natriumcacodylat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
OsO_4	Merck, Darmstadt

2 Material und Methoden

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pronase E 8,4 u/mg	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Propylenoxid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Proteinase K 900 u/ml	Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
R-Gent SE-EM (Silberverstärkung)	Aurion, Wageningen, Niederlande
Trypsin 1,130 u/mg	Sigma, St. Louis, USA
Tween	Aurion, Wageningen, Niederlande
Uranylacetat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylazin 2%	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt

2.2 Rezepte für Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Cacopuffer 0,2 M	42,8 g Na-Cacodylat in 1.000 ml dH ₂ O, mit 0,2 M HCl pH 7,4 einstellen
Citratpuffer 0,2 M	58,82 g Natriumcitrat in 1.000 ml dH ₂ O
Ethyl-Carnoy	60% Ethanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig
Glutaraldehyd 2,5%	1:10 Verdünnung aus 25% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacopuffer
Heparinisiertes 0,9% NaCl	0,9 g NaCl in 100ml dH ₂ O, darin Heparin-Natrium 25.000 I.E./5 ml 1:500 verdünnen
Lysin-Phosphatpuffer 0,2 M	3,65 g in 100 ml dH ₂ O, mit 0,1 M Na ₂ HPO ₄ -Lsg. pH 7,4 einstellen
Methyl-Carnoy	60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig

2 Material und Methoden

Na ₂ HPO ₄ -Puffer 0,2 M	35,6 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O in 1.000ml dH ₂ O
NaH ₂ PO ₄ -Puffer 0,2 M	27,6 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O in 1.000 ml dH ₂ O
Na-m-Perjodat 0,1 M	2,14 g Na-m-Perjodat in 100 ml dH ₂ O
Natriumcitrat-Lsg. 0,2 M	58,82 g Natriumcitrat-Dihydrat in 1.000 ml dH ₂ O, für 0,1 M 1:1 mit dH ₂ O mischen
Paraformaldehyd 4%	4 g Paraformaldehyd in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer
PBS, 10x, pH 7,2	NaCl 90 g Na ₂ HPO ₄ 10,9 g NaH ₂ PO ₄ 3,2 g ad 1 l dH ₂ O
Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4	500 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O auf pH 7,4 einstellen, mit dH ₂ O 1:1 auf 0,1 M verdünnen
PLP-Nakane	0,2 M Lysin-HCl 1:1 mit 0,1 M Phosphatpuffer verdünnen 52,5 ml 0,1 M Lysin-HCl 10 ml 25% PFA 1,34 g 0,1 M Na-m-Perjodat, pH 7,4 mit Na ₂ HPO ₄ -Puffer einstellen
TBS 0,1 M	1.600 mg NaCl (150 mM) in 200 ml 0,1M Tris-HCl-Puffer pH 7,4
Tris-HCl 0,2 M	24 g TRIS auf 1.000 ml H ₂ O, mit HCl pH 7,4 einstellen
Tris-HCl 0,05 M	Tris-HCl 0,2 M 1:4 mit dH ₂ O verdünnen

2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckglas 24x60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig

2 Material und Methoden

Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Kanüle 20G x 1½ ´ ´	Terumo Europe N.V, Leuven, Belgien
Kupfergrid	Plano, Marburg
Nickelgrid	Plano, Marburg
Pasteurplastpipetten	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen 200 µl (gelb), 1.000 µl (blau)	Sarstedt, Nürnberg
Polysine®Slides Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Powderfree Sempercare Handschuhe	Sempermed, Wien, Österreich
Super Pap-pen	Science Services, München
Super Frost® Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
TAAB-Kapseln	Plano, Marburg
Vasuflo® („Butterfly“)	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen

2.4 Geräte

Geräte	Hersteller
Einbettautomat	EM TP Leica, Wetzlar
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
KL 1500 LCD (Stereomikroskop)	Zeiss, Oberkochen
Konfokales Mikroskop LSM 510 META	Zeiss, Oberkochen
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf
Mikroskop Axio Imager.Z1	Zeiss, Oberkochen
Mikrotom Supercut 2050	Reichert-Jung, Wien, Österreich
pH-Meter	Knick, Berlin

Schüttler RS-PL 28-10	Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark
Supercut 2050	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Zeiss EM 10	Zeiss, Oberkochen
Ultracut-Mikrotom	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Vakuumpumpe	BOC Edwards, Crawley, West Sussex, Großbritannien
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wärmeplatte	Medax Nagel GmbH, Kiel

2.5 Gewebe unterschiedlicher Spezies

2.5.1 Maus

Die verwendeten Mäuseaugen stammten ausschließlich von gesunden Wildtyptieren der Stämme NMR-I oder CD1. Das Alter der Mäuse lag zwischen vier und acht Wochen. Diejenigen Tiere, deren Augen nicht perfusionsfixiert werden sollten, wurden durch Genickbruch getötet. Nach Sicherstellung des Todeseintritts konnten die Augen aufgrund des noch vorhandenen Augeninnendrucks aus der Orbita herausgehoben werden, ohne eine Zerreißung des Gewebes zu riskieren. Die Augen der perfusionsfixierten Tiere wurden aufgrund des geringeren Gewebeturgors freipräpariert und aus der Orbita herausgeschnitten.

2.5.2 Schwein

Die Schweineaugen wurden noch beim Schlachter nach Exenteration unfixiert in Phosphatpuffer gegeben, anschließend im Labor unter einem Stereomikroskop (KL 1500 LCD, Zeiss, Göttingen) in circa 0,5 x 1 cm große Stücke geschnitten und im Kryostaten gefriereingebettet.

2.5.3 Mensch

Die untersuchten Augen wurden der 78-jährigen Körperspenderin ohne bekannte Krankengeschichte eines Glaukoms 36 Stunden post mortem noch vor Fixierung des

gesamten Körpers entnommen, von Augenmuskeln und anhängendem Fettgewebe befreit, eröffnet und geviertelt. Daraufhin wurden neben anderen Gewebsementnahmen ca. 1,5 x 0,5 cm große Gewebstücke im Bereich des Kammerwinkels mit angrenzender Sklera herauspräpariert und sogleich in Fixationslösung gegeben oder unfixiert unmittelbar im Kryostaten mit OCT aufgefroren.

2.6 Fixierungen und Perfusionen

2.6.1 Perfusionsfixierung einer Maus

Ein Teil der verwendeten Versuchstiere wurden mit folgenden Absichten perfusionsfixiert: Zum einen können nach Perfusion die interessierenden Gefäßstrukturen der Retina, Sklera und Iris, des Ziliarkörpers und besonders des Schlemm-Kanals bei offenem Lumen und somit besser beurteilt werden. Bei Letzterem interessierte vor allem, ob sich in der Färbung ein Unterschied zwischen innerer und äußerer Endothelschicht erkennen ließ; zum anderen sollte eine Hintergrundfärbung in Gefäßen aufgrund von Antikörperbindung an Erythrozyten, die zum Teil an nicht-perfundierten Augen beobachtet wurde, verhindert werden.

Zur Narkotisierung wurden 0,04-0,06 ml einer Mischung aus 0,2 ml 2% Xylazin und 0,6 ml 10% Ketamin in die Glutealmuskulatur gespritzt. Nach Prüfen der Schmerzunempfindlichkeit wurde ein Hautschnitt in der Linea mediana von der Inguinalregion bis zum oberen Ende des Sternums gesetzt und die Haut von kaudal beginnend jeweils nach lateral abgehoben. Nach Eröffnung des Peritoneums und Durchtrennung des Diaphragmas von kaudal konnte das Kollabieren der Lungenflügel beobachtet werden. Lateral wurden auf beiden Seiten die Rippen durchgeschnitten und der vordere Teil des Brustkorbes nach kranial geklappt. Der linke Herzventrikel wurde an der Herzspitze mit einem „Butterfly“ (Vasuflo®, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen) punktiert, die Vena cava inferior durchtrennt, sodass dann das Gefäßsystem mit einer 1:500 heparinisierten 0,9% isotonen Kochsalzlösung durchgespült werden konnte. Das Ablassen der Leber und der Nieren zeigte das nahezu vollständige Entfernen des Blutes aus dem Kreislaufsystem nach circa drei Minuten an. Sodann wurde auf die Perfusion mit der Fixationslösung umgestellt. Eine Positivkontrolle für das Gelingen der Perfusionsfixierung war die Flexionskontraktion

sowohl der Extremitäten als auch des Schwanzes. Die Infusionsflaschen waren circa 50-60 cm oberhalb der Operationsfläche angebracht, sodass ein entsprechender Perfusionsdruck auch bei schwächer werdender Herzleistung gegeben war. Pro Maus wurden in etwa je 20-25 ml Kochsalz- bzw. Fixationslösung infundiert.

2.6.2 Immersionsfixierung

Sollte ein Auge entweder ausschließlich oder nach Perfusionsfixation zusätzlich immersionsfixiert werden, wurde es zunächst für circa 30-60 Minuten - je nach Größe und Zustand der Vorfixierung - ungeöffnet oder lediglich mit einer Kanüle (20G x 1½", Terumo Europe N.V, Leuven, Belgien) in der Cornea punktiert in das Immersionsfixans gegeben, um das Risiko einer allzu starken Gewebszerreißung bei der anschließenden Eröffnung des Bulbus, Entfernung der Linse und Präparation des Kammerwinkels mit angrenzenden Bereichen zu minimieren. Diese Arbeitsschritte erfolgten unter einem Stereomikroskop. Die so gewonnenen Gewebstücke wurden im Anschluss noch für 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in der Fixationslösung belassen, um ein Eindringen des Fixans über eine größere Oberfläche und von mehreren Seiten, vor allem von der Innenseite der Sklera, des Ziliarkörpers, der Iris und der Retina her zu ermöglichen. Ziel war eine möglichst gleichmäßige und vollständige Durchfixierung des verwendeten Gewebes.

2.6.3 Fixierungslösungen

2.6.3.1 Paraformaldehyd

Verwendet wurde eine 1-, 2- oder 4%-ige (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in 0,1 molarem Phosphatpuffer bei Augen, die nach dem gängigen Protokoll im Anschluss an die Fixierung und Einbettung mit Antikörpern inkubiert wurden. Die Verdünnung wurde hingegen in 0,1 molarem Cacopuffer vorgenommen, falls die Augen bei den Preembedding-Verfahren zuerst mit Antikörpern inkubiert und erst im Anschluss dann fixiert und eingebettet wurden.

2.6.3.2 Paraformaldehyd und Glutaraldehyd

Im Rahmen der immunhistochemischen Versuche wurde eine 1% PFA/2% GA-Lösung (w/v) (Glutaraldehyd: Merck, Darmstadt) in 0,1 molarem Phosphatpuffer angesetzt, da positive Resultate in Bezug auf immunhistochemische Nachweise im Bereich des Schlemm-Kanals auf elektronenmikroskopischer Ebene mit dieser Fixierung beschrieben sind (Hann et al. 2001). Die Fixation der Augen, die für die elektronenmikroskopische Beurteilung ohne Antikörperinkubation benötigt wurden, erfolgte im sogenannten Karnovsky-Fixans, bestehend aus 2% PFA/2,5% GA (w/v) in 0,2 M Cacopuffer.

2.6.3.3 Ethyl- bzw. Methyl-Carnoy

Die jeweilige Mischung wurde hergestellt aus 60% Methanol (Merck, Darmstadt) bzw. Ethanol (Roth, Karlsruhe), 30% Chloroform (Merck, Darmstadt) und 10% Eisessig (100% Essigsäure) (Merck, Darmstadt). Vor der Einbettung erfolgte die Überführung der Augen in reines Methanol bzw. Ethanol, in dem sie über Nacht bei 4°C belassen wurden. Aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit, geringerer Umweltbelastung und ebenbürtiger Ergebnisse erhielt die Carnoy-Variante mit Ethanol meist den Vorzug.

2.6.3.4 PLP-Nakane

Zur Herstellung des Fixans Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd nach Paul K. Nakane wurde eine Lösung von 4% Paraformaldehyd und 0,1 molarem Na-m-Perjodat (Sigma, St. Louis, USA) in 0,2 molarer Lysin-HCl-Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) angesetzt. Perjodat bewirkt eine Oxidation von Kohlenhydrat-seitenketten zu Aldehydgruppen, die wiederum durch Lysin quervernetzt werden. Paraformaldehyd soll Lipide und Proteine stabilisieren (McLean und Nakane, 1974).

2.7 Einbettungen und Schnitterfertigung

Tabelle 1: Übersicht über die bei den jeweiligen Einbettungen verwendeten Methoden. Post=Postembedding, Pre=Preembedding; in Epon wurden auch Augen eingebettet, deren Schnitte untersucht wurden, ohne dass sie mit Antikörpern inkubiert worden waren.

Kryo	LR-White	Epon	Technovit 8100	Technovit 9100
Post	Post, Pre	Pre, z.T. ohne Antikörperinkubation	Post, Pre	Post

Im Postembedding-Verfahren und bei den Versuchsaugen ohne Antikörperinkubation wurden die Augen entweder unfixiert oder im Zustand nach der Fixierung eingebettet und geschnitten. Im Preembedding-Verfahren erfolgte die Einbettung und das Schneiden erst nach der Antikörper-Inkubation sowie der Osmierung und Silberverstärkung.

2.7.1 Gefrierschnitte

Gefrierschnitte wurden ausschließlich im Postembedding-Verfahren angefertigt. Dazu wurden die in einem Blockhalter (Größe etwa 1,7 cm x 1,0 cm) mit OCT (Optimal Cutting Temperature Medium, Tissue Tek®, Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) umgebenen Augen in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren, die Blöcke im Innenraum des Microm HM 500 OM Kryostaten (Microm International, Walldorf) bei einer Umgebungstemperatur von -25°C auf einen Metallblockhalter aufgefroren und im Anschluss in 7-15 µm dicke Lagen geschnitten. Diese Schnitte wurden anschließend auf Superfrost®Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen, mit einem Fön getrocknet und, falls die Augen unfixiert eingebettet wurden, mit einer 2%igen PFA-Lösung für 5-10 Minuten nachfixiert. Durch dreimaliges Waschen in PBS oder 0,1 molarem Phosphatpuffer wurde das am Objektträger haftende Tissue Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) entfernt, sodass nach dem Umranden der Schnitte mit einem Fettstift (Super Pap-pen, Science Services, München) mit der Blockierung begonnen werden konnte.

2.7.2 LR-White

LR-White (London Resin Company Ltd, London, Großbritannien), ein Glykolmethakrylat, wird seit mehr als 25 Jahren für immunhistochemische Untersuchungen verwendet (Yang et al., 2003) und fand seine Anwendung sowohl im Post- als auch im Preembedding-Verfahren. Im Rahmen des Postembedding wurden die von den fixierten Augen interessierenden Anteile nach einer Entwässerungsreihe mit Ethanol (70%, 90%, 100% je 2x15 Minuten) bei 4°C in eine 2:1-Mischung aus LR-White und 100% Ethanol für eine Stunde bei 4°C eingebracht. Es folgte, jeweils bei 4°C, eine einstündige Infiltration der Gewebestücke in LR-White sowie nach Wechsel des LR-White über Nacht. Die Ausbettung in frisches LR-White erfolgte in TAAB-Kapseln in der Vakuumpumpe (BOC Edwards, Crawley, West Sussex, Großbritannien), um etwaige Luftbläschen im ausgehärteten Harz zu vermeiden. Die Aushärtung des LR-White beanspruchte einen Zeitraum von mindestens zwei Tagen entweder bei 4°C über UV-Licht (360 nm) oder bei 55°C im Wärmeschrank. 1 µm dünne Schnitte konnten an Ultracut-Mikrotomen (Reichert-Jung, Wien, Österreich) mit Wassertrog-Glasmessern (gebrochen aus Glasstreifen, Alkar, Stockholm, Schweden) angefertigt, auf Superfrost®-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und auf diesen durch Erwärmen bei 60°C auf der Wärmeplatte (Medax Nagel GmbH, Kiel) fixiert werden. Die aufgezogenen Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet. Nach einer Vorverdauung mit 0,01 M oder 0,1 M Natriumcitrat in 0,1 M Phosphatpuffer bei 85°C für 30-60 Minuten oder verschiedenen Proteasen wie z.B. 0,01% (w/v) Pronase (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in 0,05 M Tris-HCl für 10 Minuten, Proteinase K (100 µl Proteinase K (18,9 mg/ml) auf 47,0 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer) (Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada) für 10 Minuten oder 0,1% Trypsin (Sigma, St. Louis, USA) in 0,05 M Tris-HCl für 10 Minuten, erfolgte die Antikörper-Inkubation unter Verwendung des fluoreszierenden Cy3-Sekundärantikörpers.

Mit dem Ziel der elektronenmikroskopischen Beurteilung wurden die Ultradünnschnitte auf Nickelgrids (Plano, Marburg) aufgezogen und in 0,05% Tween in Blocking-Lösung blockiert, um das Gewebe durchgängiger für die Antikörper zu machen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit panECA als Primärantikörper sowie dem US-Goldantikörper (Aurion, Wageningen, Niederlande) als Sekundärantikörper.

Nach der Nachfixierung mit 2,5% Glutaraldehyd (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in 0,1 M Cacopuffer sowie der Silberverstärkung (R-Gent SE-EM, Aurion, Wageningen, Niederlande) für 15 Minuten wurden die Schnitte mit Uranylacetat (10%, 10 min) (Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg) sowie Bleicitrat (10%, 5 min) (Leica, Bensheim) unter Lichtabschluss kontrastiert.

Für Preembedding-Versuche mit dem Ziel einer anschließenden elektronenmikroskopischen Auswertung wurden die Versuchsaugen blockiert, mit Antikörper inkubiert (US-Gold als Sekundärantikörper) und deren Bindung mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 molarem Cacopuffer fixiert. Der Kontrastierung des späteren Schnittes und einer weiteren Fixierung diente eine 30minütige Osmierung in 1%iger wässriger OsO_4 -Lösung (Merck, Darmstadt). Die Silberverstärkung mit einer Dauer zwischen 15-45 Minuten erfolgte nach dem gängigen Protokoll und diente einer Signalverstärkung durch Anlagerung von Silberpartikel an den Goldanteil des Ultrasmall-Goldantikörpers. Nach einer Entwässerungsreihe mit Ethanol folgte auch hier die Ausbettung nach dem Protokoll sowie das Schneiden von Ultradünnschnitten mit dem Ultracut-Mikrotom. Für die lichtmikroskopische Kontrolle der Preembedding-Versuche war das Protokoll mit Ausnahme einer verlängerten Silberverstärkung (30-60 Minuten) identisch. Die Schnitte für die elektronenmikroskopische Beurteilung wurden auf Kupfergrids aufgebracht und auch in diesem Fall mit Uranylacetat sowie Bleicitrat kontrastiert.

2.7.3 Technovit 8100 und 9100

Zur Herstellung von Semi-Dünnschnitten bzw. im Falle des Technovit 9100 auch von Metallmesserschnitten wurde eine Einbettung in Technovitharz vorgenommen. Während Technovit 8100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim) auf Glykolmethakrylat basiert, das vom Objektträger vor der Antikörperinkubation nicht entfernt werden kann, ist die Grundlage des Technovit 9100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim) ein Methylmethacrylat. Dieses Methylmethakrylat bietet den Vorteil, dass der Schnitt auf dem Objektträger entharzt werden kann und dass dadurch mehr Antigene exponiert werden. Außerdem kann die Polymerisation des Technovit 9100 bei sehr niedriger Temperatur, nämlich -20°C , erfolgen, wodurch die Antigenität des Gewebes erhalten bleibt. Da Yang et al. (2003) positive immunhistochemische Ergebnisse mit Technovit

9100 beschreiben, wurden zusätzlich zum langjährig in unserem Labor verwendeten Technovit 8100 auch Einbettungen in Technovit 9100 durchgeführt.

Im Rahmen des Pre- und Postembedding mit Technovit 8100 wurden die Gewebestücke zunächst eine Stunde bei 4°C unter mehrfachem Wechsel in 100% Aceton dehydriert und im Anschluss für 8-24 Stunden bei 4°C in Infiltrationslösung (bestehend aus 0,6 g Härter I in 100 ml Basisflüssigkeit) gegeben. In TAAB-Formen (Plano, Marburg) wurde bei 4°C die Einbettlösung (30 ml Infiltrationslösung A und 1,0 ml Härter II) pipettiert, darin dann das Gewebestück eingelassen und orientiert. Auf Trockeneis gelagert wurden die befüllten TAAB-Formen in den Kühlschrank (4°C) gegeben und das Harz über Nacht gehärtet. Nach Entfernen der TAAB-Kapsel und Einspannen des Blockes konnten mit Glasmessern am „UltracutE“-Ultramikrotom (Reichert-Jung, Kirchseeon) 1-2 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Superfrost®-Objektträger aufgetragen werden.

Die Entwässerung der Gewebestücke für die Technovit-9100-Einbettung erfolgte über eine aufsteigende Ethanolreihe (je eine Stunde 70%, 80%, 96%, 96%, 100%, 100%, 100%) und anschließender Xylol-Infiltration (zweimal je eine Stunde). Die Präinfiltration erfolgte in drei Schritten: zunächst einstündig eine 1:1-Lösung aus Xylol und Basislösung, danach zweimal jeweils eine Stunde Präinfiltration in einer Lösung aus Basislösung (50 ml) und Härter 1 (250 mg). Für die Infiltration, die über mehrere Tage dauern kann, wird eine Lösung aus Basislösung (25 ml), Härter 1 (125 mg) und 2 g PMMA-Pulver (Polymethylmethacrylat) verwendet. Die Polymerisationslösung ist ein 9:1-Gemisch aus Stammlösung A (Basislösung, PMMA-Pulver, Härter 1) mit Stammlösung B (Härter 2, Basislösung, Regler). Die Einbettung erfolgt luftdicht bei -20°C in TAAB-Kapseln und dauert 4-5 Tage. Aufgrund diverser Schwierigkeiten beim Schneiden dieses Harzes mit Glasmessern wurden mit einem Metallmesser am Mikrotom Supercut 2050 (Reichert-Jung, Wien, Österreich) wesentlich dickere Schnitte (etwa 10 µm) angefertigt, diese dann mit 30% Ethanol auf Polysine®Slides-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht und im Wärmeschrank unter Beschwerung getrocknet. Zum Teil erfolgte im Anschluss eine Entharzung mit Methylethoxyacetat (MEA) für 2x30 Minuten, bevor die Antikörperinkubation nach

dem in Tabelle 2 (s. 2.12.1.1) genannten Postembeddingprotokoll vorgenommen wurde.

Im Falle der Technovit-8100-Einbettung wurden die Schnitte für die Preembeddingversuche auf den Objektträgern mit Dako Mounting Medium (Dako Cytomation, Hamburg) und einem Deckglas versehen.

2.7.4 Epon

Die Einbettung von Gewebestücken in Epon-Harz wurde im Rahmen von Preembedding sowie zur Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen ohne Antikörperinkubation verwendet. Dazu wurden die Augen nach der Fixation und eventuellen Antikörperinkubation (Protokoll s. 2.12.2) 30 Minuten mit 1%iger wässriger OsO_4 -Lösung nachfixiert und kontrastiert, gründlich mit Aqua destillium gewaschen und anschließend nach dem Protokoll von R-Gent SE-EM (Aurion, Wageningen, Niederlande) silberverstärkt. Die Entwässerung erfolgte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 2x10 Minuten 70%, 80%, 90%, 100%). Mit Propylenoxid als Intermedium wurden die Gewebestücke wie folgt mit Epon infiltriert: 2x10 Minuten Propylenoxid, 1 Stunde Propylenoxid:Epon=3:1, über Nacht Propylenoxid:Epon=1:3. Die Infiltration in 100% Epon erfolgte im Brutschrank, zunächst 24h bei 60°C, dann 48h bei 90°C. Die gebrauchsfertige Eponlösung wurde als 1:1-Gemisch zweier Stammlösungen mit 2% DMP-30 als Beschleuniger hergestellt, wobei als Stammlösung A eine Mischung aus 62 ml Glycidether 100 und 100 ml DDSA als Härter, als Stammlösung B eine Mischung aus 100ml Glycidether 100 und 89 ml MNA als Härter verwendet wurde (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Für eine elektronenmikroskopische Beurteilung wurden an einem „UltracutE“-Ultramikrotom (Reichert-Jung, Kirchseeon) von Frau Margit Schimmel freundlicherweise Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt, diese dann auf Kupfergrids aufgetragen und mit Uranylacetat (10%, 10 min) sowie Bleicitrat (10%, 5 min) unter Lichtabschluss kontrastiert.

2.8 Blockierungslösung

Um unspezifische Bindungen zu blockieren und damit eine mögliche Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurde vor der Antikörperinkubation Blockierungslösung aufgetragen. Beim Postembedding für Fluoreszenzmikroskopie

handelte es sich dabei um eine Lösung von 1% BSA (Serva, Heidelberg), 0,1% Schweinegelatine (Sigma, St. Louis, USA) und 0,05% Natriumazid in 0,1 molarem Phosphatpuffer (Blockierungsdauer 30 Minuten bei Raumtemperatur), im Falle des Postembedding für Elektronenmikroskopie um eine Lösung von 10% Ziegen-Serum (da der Sekundär-US-Goldantikörper aus der Ziege stammt), 0,8% NaCl sowie 0,1% CWFS-Gelatine in Tris-HCl-Puffer, pH 7,4. Beim Preembedding wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 10% Ziegenserum und 0,1% CWFS-Gelatine in PBS blockiert.

2.9 Antikörper

Laut Shue et al. (2008) ist PV-1 mit dem *Mouse Endothelial Cell Antigen 32* (MECA-32) identisch, gegen das der Antikörper panECA (MECA-32), sc-19603 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA) gerichtet ist.

Das Antigen CD 31, auch *Platelet-Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1* (PECAM-1) genannt, ist in seiner Lokalisation beschränkt auf das vaskuläre System, namentlich auf Thrombozyten, Neutrophile, ausgewählte T- sowie Endothelzellen. Innerhalb der einschichtigen Endothelien findet es sich an den Zell-Zell-Grenzen, in Blutgefäßen an luminalen Oberflächen (Ilan und Madri 2003).

Primärantikörper		
Antikörper	panECA (MECA-32): rt-anti-m PV-1	gt-anti-m CD 31/PECAM-1
Antikörperklasse	monoklonaler IgG2 α aus Ratte sc-19603, Lot#B252	monoklonaler IgG aus Ziege Catalog AF3628, Lot YZU01
Hersteller	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Konzentration	200 μ g/ml PBS	200 μ g/ml PBS
Zielspezies	Maus	Maus
Spenderspezies	Ratte	Ziege
Verdünnung	1:50-1:200	1:100

2 Material und Methoden

Die verwendeten Primärantikörper wurden in mit dem jeweiligen Puffer verdünnter 1:10 Blocking-Lösung angesetzt.

Sekundärantikörper - Fluoreszenzmikroskopie		
Antikörper	dk-anti-rt Cy3	rb-anti-gt+Alexa488
Antikörperklasse	Affinitätsgereinigter IgG (H+L)	F(ab') ₂ -Fragment eines IgG (H+L)
Hersteller	Code 705-165-147, Lot 77222 Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA	Catalog A-21222, Lot 84C2 Molecular Probes, Eugene, USA
Konzentration	1,5 mg/ml	2 mg/ml
Zielspezies	Ratte	Ziege
Spenderspezies	Esel	Kaninchen
Gekoppelter Farbstoff	Cy3 (Rhodamine)	Alexa488
Absorption A max	550 nm	495 nm
Emission E max	570 nm	518 nm
Verdünnung	1:800	1:1000

Die fluoreszierenden Sekundärantikörper wurden in 0,05% Natriumazid/0,1 M Phosphatpuffer verdünnt.

Sekundärantikörper – Licht- und Elektronenmikroskopie	
Antikörper	UltraSmall gold gt-anti-rt
Antikörperklasse	IgG (H&L) Cat.#25181, Lot Gra-71003/2
Hersteller	Aurion, Wageningen, Niederlande
Konzentration	60-80 µg/ml

Zielspezies	Ratte
Spenderspezies	Ziege
Gekoppeltes Gold	Ultrasmall 0,8 nm
Verdünnung	1:100

Die Verdünnung des Sekundär-Goldantikörpers erfolgte in 0,2% BSA/TBS.

2.10 Zellkernfärbung bzw. Eindeckeln

Auf die mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubierten Schnitte wurden vor dem Aufbringen eines Deckglases 2 Tropfen 1:10 Dapi pipettiert. Dapi lagert sich an AT-reiche Regionen der DNA im Zellkern an und erscheint im Fluoreszenzmikroskop betrachtet blau. Schnitte, die für die lichtmikroskopische Betrachtung angefertigt und mit Goldantikörper inkubiert worden waren, wurden mit dem Xylol haltigen Vitro Clud® (Langenbrück, Emmendingen) eingedeckelt.

2.11 Mikroskope und Kamera

2.11.1 Hellfeld-und Fluoreszenzmikroskop

Für eine licht- bzw. fluoreszenzmikroskopische Beurteilung wurden Schnitte mit dem Mikroskop Axio Imager.Z1 (Zeiss, Oberkochen) betrachtet.

2.11.2 Konfokales Mikroskop

Bei dem verwendeten konfokalen Mikroskop handelte es sich um ein Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Oberkochen).

2.11.3 Elektronenmikroskop

Bei dem zur Verfügung stehenden Elektronenmikroskop handelte es sich um ein EM 10 Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) der Firma Zeiss (Oberkochen), dessen Beschleunigungsspannung immer 120 kV, die Belichtungszeit zwischen 600 ms und 1.000 ms betrug.

2.11.4 Kamera

Die in der Arbeit aufgeführten elektronenmikroskopischen Bilder wurden von einer 2K-Digitalkamera der Firma Zeiss (Oberkochen) aufgenommen. Die Abbildungen im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie entstanden mit der Axiocam Mrm, die lichtmikroskopischen Kontrollaufnahmen wurden mit der Axiocam Mrc vorgenommen. Das konfokale Mikroskop war an eine Axiocam Hrc angeschlossen (alle Kameras von Zeiss, Oberkochen).

2.12 Methoden

2.12.1 Postembedding-Verfahren

2.12.1.1 Fluoreszenz-Färbung

Tabelle 2: Schematischer Überblick über das Protokoll der Fluoreszenz-Färbung im Rahmen des Postembedding-Verfahrens

Nach Enukleation Einbringen in Puffer, in den meisten Fällen Perfusions- oder Immersionsfixierung				
Einbettung				
Kryo	LR-White	Technovit 8100	Technovit 9100	
Schnittanfertigung, Schnittdicke				
Gefrierschnitte mit Kryotom	Semi-dünn mit Mikrotom (Glasmesser)	Semi-dünn mit Mikrotom (Glasmesser)	Semi-dünn mit Mikrotom (Glasmesser mit Wassertrog)	Schnitte mit Metallmesser
7-15 µm	1-2 µm	1-2 µm	1 µm	10 µm
Umranden der Schnitte mit einem Fettstift (Super Pap-pen, Science Services, München)				
Behandlung der Schnitte				
z.T. Nachfixation mit PFA	z.T. Andauung mit Proteasen und/oder Citrat		z.T. Deplastizieren mit MEA 2x30 Min.	
3x5 Min. Spülen mit Puffer				
30-60 Min. Blockierung bei RT in feuchter Kammer auf Schüttler (Heto Lab Equipment,				

Allerod, Dänemark)
Inkubation mit primärem Antikörper in 1:10 Blocking-Lösung über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer
3x5 Min. Spülen mit Puffer
60 Min. Inkubation mit sekundärem Antikörper in 0,05% Natriumazid/0,1 M Php bei Raumtemperatur in feuchter Kammer auf Schüttler
3x5 Min. Spülen mit Puffer
Kernfärbung mit DAPI, 1:10 Verdünnung des Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in Flourescent Mounting Medium (DakoCytomation, Hamburg)
Eindeckeln

2.12.1.2 Färbung mit Goldantikörper für Lichtmikroskopie

Bei einem Teil der Schnitte von einem Auge, das im Rahmen eines Preembedding-Versuches in PLP fixiert, mit Antikörper inkubiert und anschließend in LR-White eingebettet wurde, erfolgte zum Zweck einer lichtmikroskopischen Kontrolle eine Silberverstärkung von 15-60 Minuten, um eine Lokalisation des eventuell gebundenen sekundären Goldantikörpers auch am Lichtmikroskop mit einer maximalen Objektivvergrößerung von 100 erkennen zu können. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden diese Schnitte auf den Super Frost® Objektträgern mit dem Xylol-haltigen Vitro Clud® (Langenbrück, Emmendingen) eingedeckelt.

2.12.2 Preembedding-Verfahren

Tabelle 3: Schematischer Überblick über das Protokoll der durchgeführten Preembedding-Verfahren

Fixierung der präparierten Augenstücke im jeweiligen Fixans
Auswaschen des Fixans mit Cacopuffer (0,1 M)
5 Min. Tris HCl 0,1M

1 Stunde Blockierung
Inkubation mit primärem Antikörper in 0,2% BSA/TBS über zwei Nächte bei 4°C in feuchter Kammer
4x10 Min. 0,2% BSA/TBS
2x5 Min. 0,1 M Php
30 Min. Nachfixierung mit 0,1% GAH in 0,1 M Php
5 Min. 0,1 M Php
5 Min. 0,2% BSA/TBS
Inkubation mit sekundärem Goldantikörper in 0,2% BSA/TBS über zwei Nächte bei 4°C in feuchter Kammer
4x10 Min. TBS
10 Min. Cacopuffer 0,1 M
2 Stunden Nachfixierung mit 2,5% GA/Cacopuffer (0,1 M)
2x10 Min. Cacopuffer 0,1 M
30 Min. Osmierung in 1% wässriger Lösung
4x5 Min. dH ₂ O
10-20 Min. Silberverstärkung
4x5 Min. dH ₂ O
Einbettung in LR-White, Epon oder Technovit 8100

2.12.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen ohne Färbung

Nach der Fixation in Karnovsky-Fixans (2% PFA/2,5% GA (w/v) in 0,2 M Cacopuffer) wurden die Augen in Epon eingebettet, mit dem „UltracutE“-Ultramikrotom geschnitten und im Anschluss unter dem Elektronenmikroskop betrachtet. Die in der Arbeit gezeigten Aufnahmen wurden mit der 2K-Digitalkamera der Firma Zeiss angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

Bei der immunhistochemischen Untersuchung mit dem Antikörper gegen PV-1 zeigte sich eine spezifische Färbung der Choriocapillaris und der Kapillaren des Ziliarkörpers. Keine PV-1-Markierung ließ sich hingegen in den Gefäßen der Iris sowie innerhalb der Retinakapillaren beobachten. Weiterhin waren die episkleralen Gefäße sowie die Wandung des Schlemm-Kanals positiv gefärbt. Der Erfolg der Antigen-Antikörper-Erkennung und somit die Intensität der spezifischen Anfärbung war stark von der Art des verwendeten Fixans sowie des Einbettmediums abhängig. Während in unfixiertem Zustand (Abb. 25 und 26) und mit ethanolhaltigem Fixans (Ethyl-Carnoy) (Abb. 24) eine spezifische Färbung zu erreichen war, konnte bei der Verwendung von Paraformaldehyd ein positives Ergebnis nur nach alleiniger Perfusionsfixierung (Abb. 21 und 22), nicht jedoch nach zusätzlicher Immersionfixierung erhalten werden. Die Fixierung bzw. Nachfixierung von unfixiert in OCT (Optimal Cutting Temperature Medium) gefriereingebetteten Schnitten mit PLP-Nakane oder glutaraldehydhaltigen Lösungen (2%PFA/GA) führte lediglich zu unspezifischen Färbungen. Mit Blick auf die verschiedenen Einbettprotokolle bzw. -medien wurden sehr gute Ergebnisse im Rahmen der Gefriereinbettung erzielt. Eine Einbettung in Harze beeinträchtigte das Ergebnis in unterschiedlichem Ausmaß: Bei Verwendung von Technovit 9100 erschien trotz ausbleibender CD 31-Färbung zumindest noch die Markierung von PV-1 spezifisch; bei der Betrachtung von in Technovit 8100 eingebetteten Augen störte hingegen die starke Hintergrundfärbung, nach LR-White- bzw. Epon-Einbettung war weder eine PV-1- noch eine CD 31-Markierung zu erreichen. Die Strukturhaltung des Gewebes wurde in hohem Maß von der Art des Fixans bestimmt, sodass in unfixiertem Zustand mit kurzzeitiger PFA-Nachfixierung die Strukturen gut (Abb. 25), in Ethyl-Carnoy-fixierten Augen besser (Abb. 24) und in den PFA-perfusionsfixierten Augen am besten zu beurteilen waren (Abb. 21 und 22).

Die Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen PV-1 und dem endothelspezifischen Marker CD 31 zeigte eine Kollokalisierung von PV-1 und CD 31 in den Gefäßen des Ziliarkörpers, in der Choriocapillaris, im Schlemm-Kanal sowie in den episkleralen Venen (Abb. 21C, 22C, 25C, 26C), was darauf schließen lässt, dass PV-1 in den

Gefäßendothelien lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu waren die Gefäße der Iris (Abb. 21) sowie die Kapillaren innerhalb der Retina zwar für CD 31, jedoch nicht für PV-1 angefärbt (Abb. 26C).

In Kontrollexperimenten, bei denen unter sonst gleichen Bedingungen die Zugabe des Primärantikörpers unterlassen wurde, konnte keine Färbung beobachtet werden (Abb. 23).

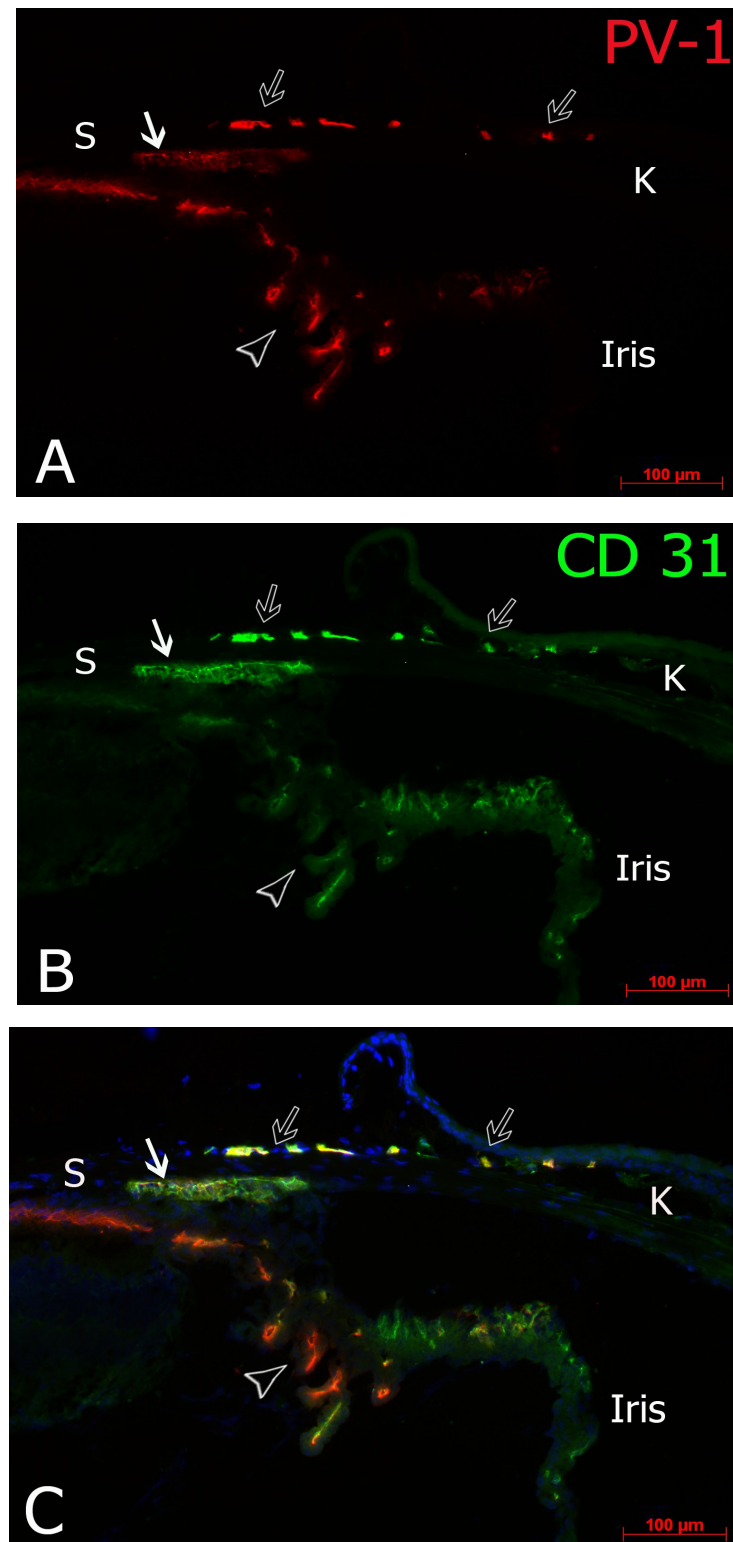


Abbildung 21: Ausschnitt aus der vorderen Augenkammer eines Mauseuges, das mit 2% PFA perfusionsfixiert wurde (ohne weitere Immersionsfixierung), Gefriereinbettung. A zeigt in rot die Markierung des Membranproteins PV-1 mit einem fluoreszierenden Antikörper im Ziliarkörper (Pfeilkopf), im Schlemm-Kanal (weißer Pfeil) sowie in den episcleralen Venen (schwarzer Pfeil). In B ist die Markierung des Endothelmarkers CD 31 grün dargestellt, die sich im Vergleich zur PV-1 Markierung zusätzlich noch in den Gefäßen der Iris beobachten lässt. C zeigt als Zusammensetzung beider Färbungen die Kolo-kalisation von PV-1 und CD 31 im Ziliarkörper, im Schlemm-Kanal sowie in den episcleralen Venen, nicht jedoch in den Gefäßen der Iris. Kernfärbung durch DAPI blau. S=Sklera, K=Kornea

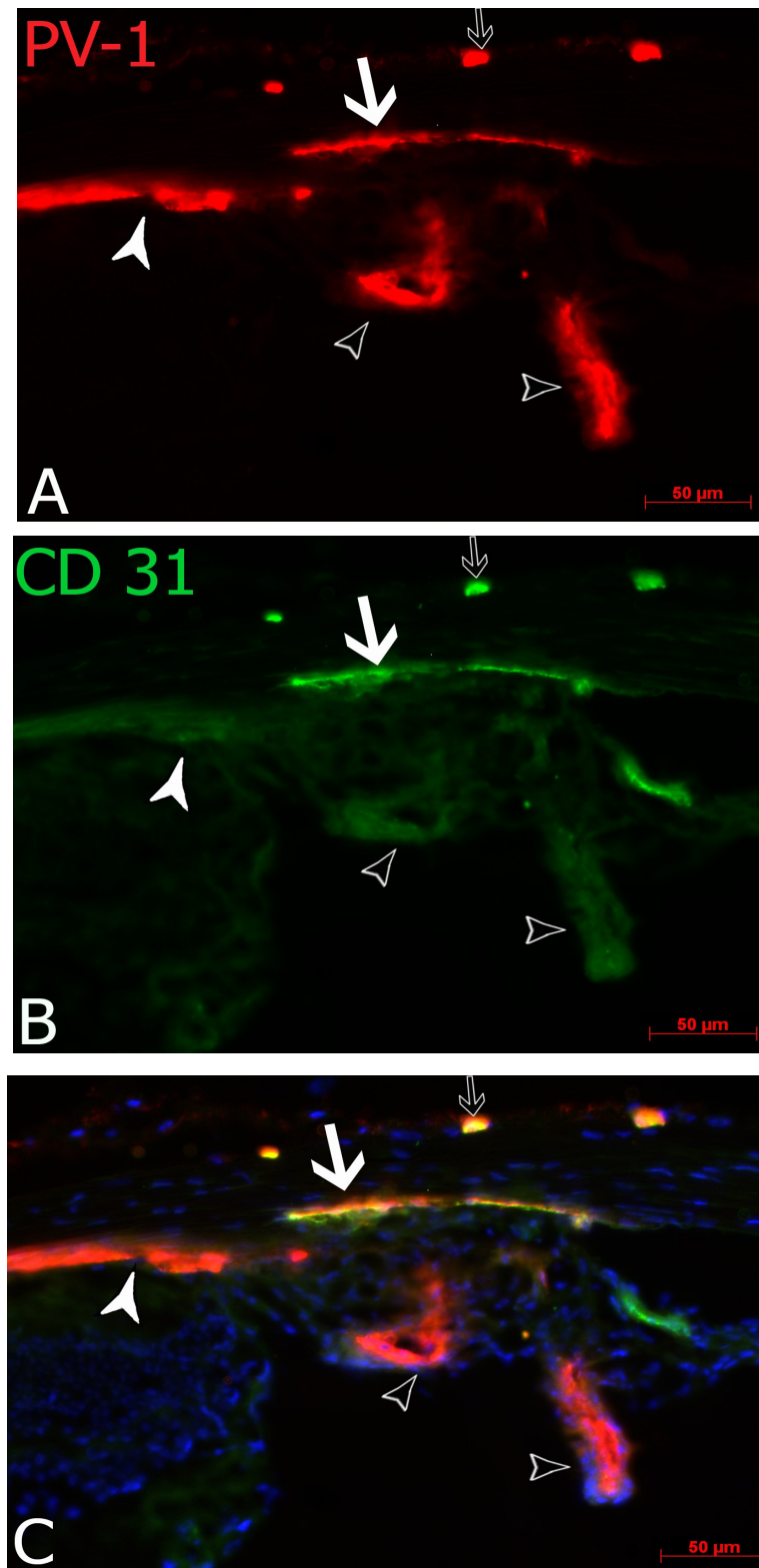


Abbildung 22: Kammerwinkel mit Kammerwasserabflussgefäßen eines Mauseuges; Perfusionsfixierung mit 2% PFA ohne weitere Immersionsfixierung, Gefriereinbettung. Sowohl in A (Markierung von PV-1 in rot) als auch in B (Markierung von CD 31 in grün) findet sich eine Markierung von Endothelien im Ziliarkörper (schwarze Pfeilspitze), im Schlemm-Kanal (weißer Pfeil), in den episklralen Venen (schwarzer Pfeil) sowie in der beginnenden Choriocapillaris (weiße Pfeilspitze). Gefäße in der Iriswurzel werden jedoch nur für CD 31 (B) angefärbt. Die Kolo-kalisation ist in C an der hellrot-gelblichen Mischfarbe zu erkennen. ZK=Ziliarkörper, SK=Schlemm-Kanal, eV=episklrale Venen, Chc=Choriocapillaris

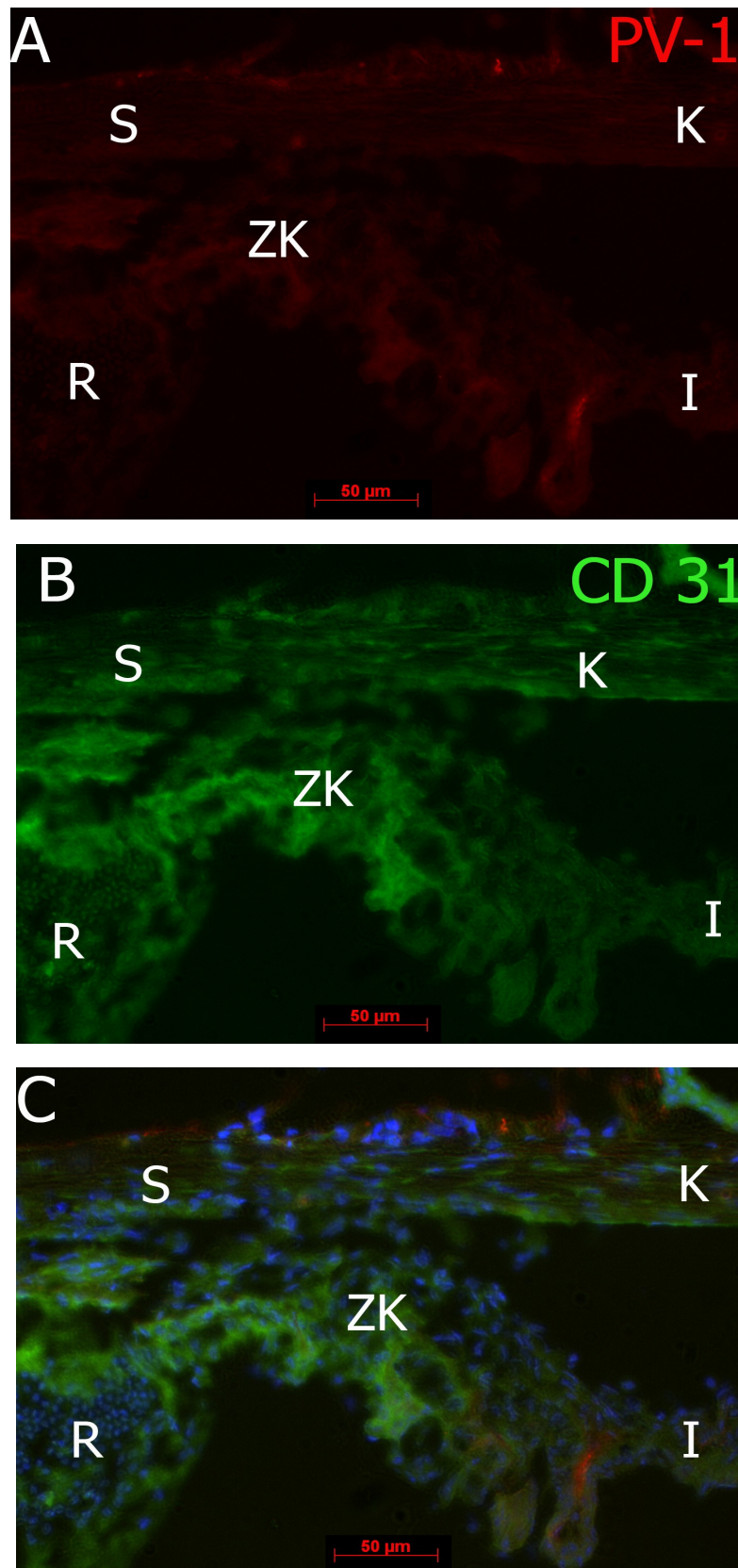


Abbildung 23: Negativkontrolle der Doppelfärbung von PV-1 (A) und CD-31 (B) an Schnitten durch die vordere Augenkammer eines Mauseuges im direkten Vergleich zu Abb. 22; weder PV-1 (A, in rot) noch CD 31 (B, in grün) wurden nach Weglassen des primären Antikörpers durch den sekundären fluoreszierenden Antikörper angefärbt. Kernfärbung im zusammengesetzten Bild (C) durch DAPI (blau), Perfusionsfixierung mit 2% PFA ohne weitere Immersionsfixierung, Gefriereinbettung. I=Iris, K=Kornea, R=Retina, S=Sklera, ZK=Ziliarkörper

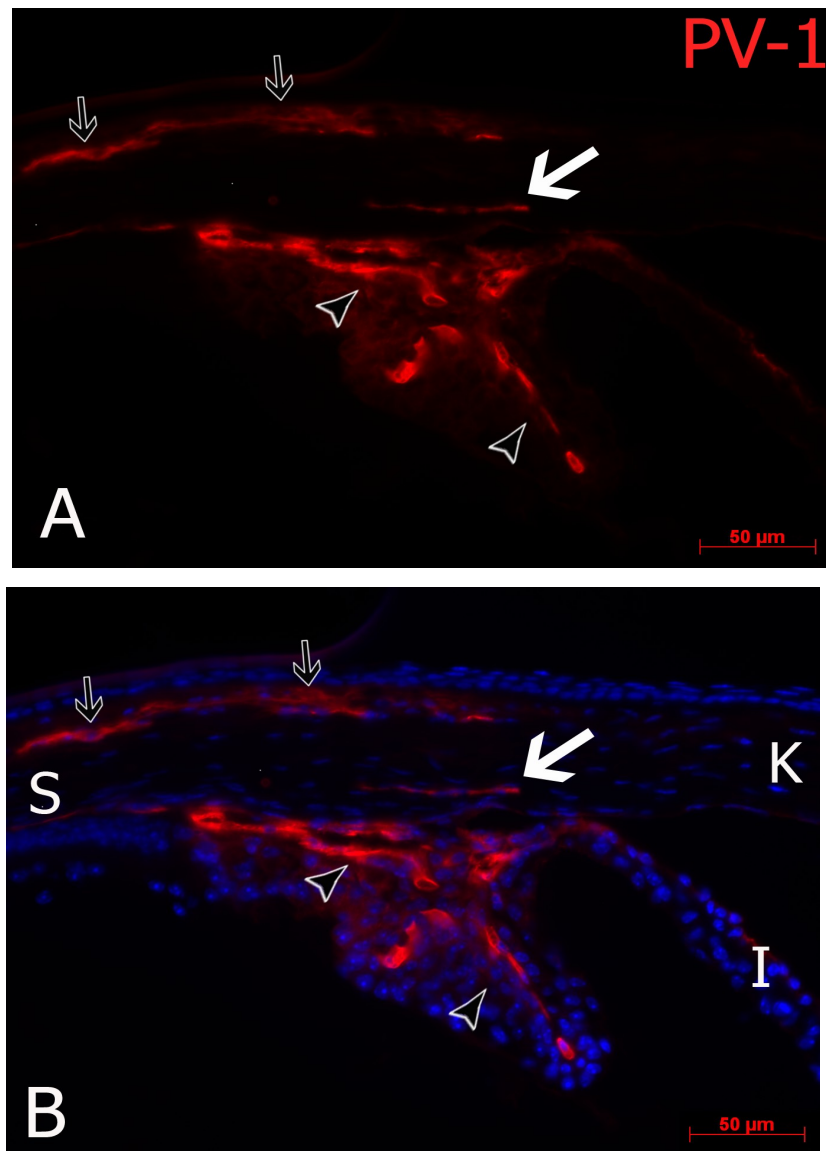


Abbildung 24: In der Einzelfärbung ein Ausschnitt aus der korneoskleralen Übergangszone mit den angrenzenden Strukturen eines mit Ethyl-Carnoy fixierten Mauseuges. Auch hier ist eine spezifische Markierung von PV-1 (rot) mittels des fluoreszierenden Antikörpers panECA im Ziliarkörper (schwarze Pfeilspitze), in den episcleralen Venen (schwarzer Pfeil) und im Schlemm-Kanal (weißer Pfeil) zu erkennen (A). In manchen Fällen war bei Fixierung mit Ethyl-Carnoy eine geringe Färbung im Bereich der Iriswurzel zu beobachten, die in der Peripherie der Iris (I) allerdings nicht mehr vorhanden war. Kernfärbung in B durch DAPI blau; K=Kornea, S=Sklera; Gefriereinbettung

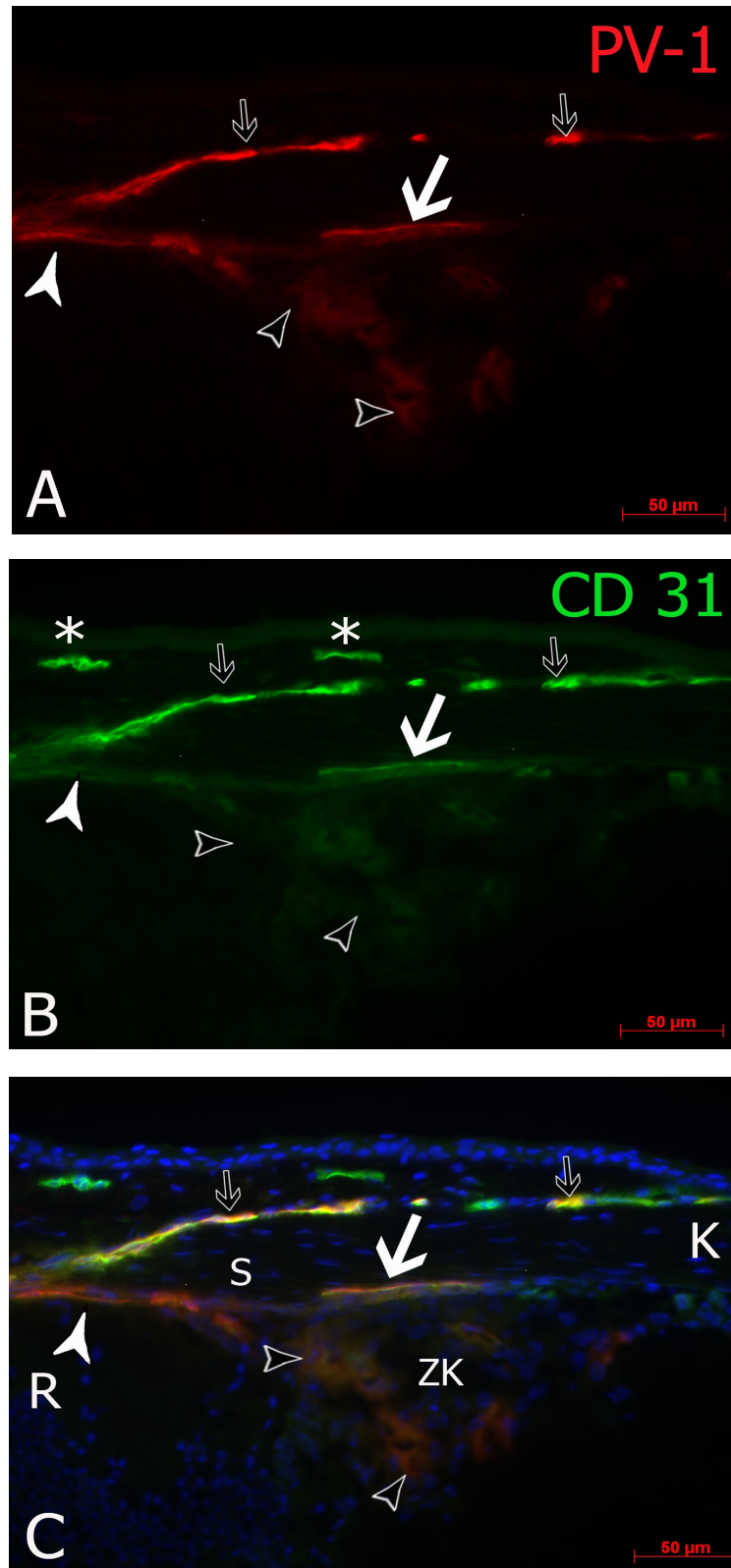


Abbildung 25: Doppelfärbung an Schnitten eines unfixierten Mauseuges, die auf den Objektträgern 5 Minuten mit 2% PFA nachfixiert wurden (Gefriereinbettung); Blick auf einen Ausschnitt der vorderen Augenkammer. Bei weniger gut erhaltener Gewebestruktur ist die Färbung spezifisch. Positiv sowohl für PV-1 (A, rot) als auch für CD 31 (B, grün) zeigen sich Gefäße im Ziliarkörper (schwarze Pfeilspitze), die episkleralen Venen (schwarzer Pfeil), der Schlemm-Kanal (weißer Pfeil) sowie die beginnende Choriocapillaris (weiße Pfeilspitze), wobei hier die Markierung der episkleralen Gefäße am farbintensivsten ausfällt. Bei den CD 31-positiven, aber PV-1-negativen Gefäßen in B und C (*), die der Sklera mit ihren episkleralen Venen aufliegen, könnte es sich um Kapillaren noch anhängender Augenmuskeln handeln.

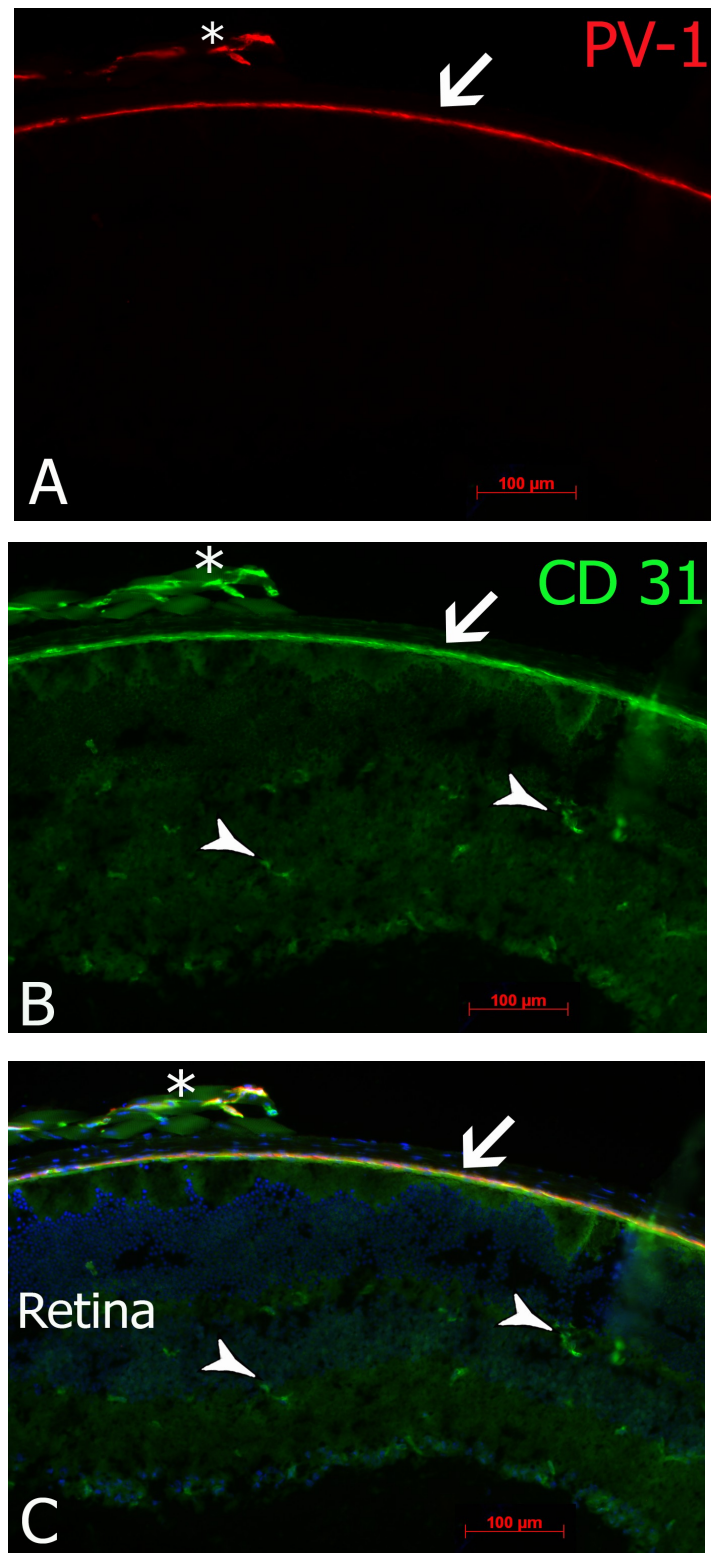


Abbildung 26: Schnitt durch die Retina eines unfixierten gefriereingebetteten Mauseuges. Während der Antikörper gegen PV-1 (A, rot) nur die Choriocapillaris (weißer Pfeil) anfärbt, markiert der gegen CD 31 gerichtete Antikörper (B und C, grün) zusätzlich zur Choriocapillaris auch innerhalb der Retina gelegene Äste der A. centralis retinae (weiße Pfeilspitze). Bei den sowohl PV-1- als auch CD 31-positiven Gefäßen (*) im oberen linken Bildbereich (C) handelt es sich am wahrscheinlichsten um das angrenzende Fettgewebe versorgende Kapillaren.

Um zu analysieren, ob die positive Färbung im Schlemm-Kanal auf eine PV-1-Markierung in der inneren oder der äußeren Wand oder gar in beiden Wänden zurückzuführen ist, wurden von Schnitten eines mit Ethyl-Carnoy fixierten und kryoeingebetteten Mausauges mit einer Dicke von 10 µm etwa 40 Z-Scheiben mittels eines konfokalen Mikroskops angefertigt. In Abb. 27 lassen sich beim Blick auf den Schlemm-Kanal zwei dünne Linien erkennen, wobei die dem Trabekelwerk und Ziliarkörper zugewandte Linie die innere Wand, die den episkleralen Venen zugewandte die äußere Wand des Kanals darstellt.

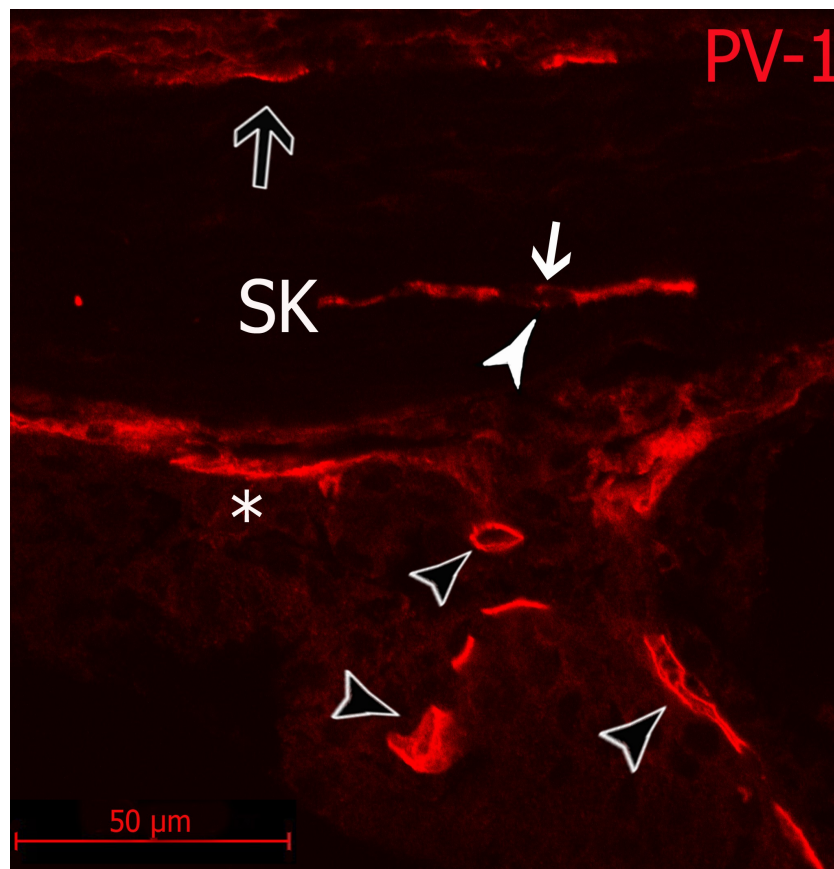


Abbildung 27: Aufnahme eines Schnittes durch ein mit Ethyl-Carnoy fixiertes und gefriereingebettetes Mausauge mittels eines konfokalen Mikroskops. Im Vergleich zu den bisher gezeigten Abbildungen ist hier aufgrund der höheren Auflösung eine Differenzierung zwischen innerer (weiße Pfeilspitze) und äußerer (weißer Pfeil) Wand des Schlemm-Kanals (SK) möglich. Auch die Gefäßzeichnung im Ziliarkörper (schwarze Pfeilspitzen) ist differenzierter zu beurteilen. Des Weiteren erkennt man die Markierung in den episkleralen Venen (schwarzer Pfeil) sowie in der Choriocapillaris (*).

3.2 Elektronenmikroskopie

Um zu analysieren, ob im Endothel des Schlemm-Kanals und der episkleralen Gefäße Strukturen wie Transendotheliale Kanäle oder Fenster mit Diaphragmata vorhanden sind, die das ultrastrukturelle Korrelat der PV-1-Färbung darstellen könnten, wurden diese Endothelien unter dem Elektronenmikroskop beurteilt. Des Weiteren wurden zum Vergleich und zur besseren Einordnung der Befunde im Schlemm-Kanal sowie den episkleralen Venen die ebenfalls PV-1-positiven Kapillaren des Ziliarkörpers und die Choriocapillaris betrachtet.

Dabei fanden sich in der Choriocapillaris (Abb. 28) auf beiden Seiten reichlich plasmalemmale Strukturen: Viele Caveolae sowie Transendotheliale Kanäle (TEC) mit *Stomatal Diaphragmas*, des Weiteren äußerst zahlreich Fenster mit *Fenestral Diaphragmas*, wobei in der inneren, also dem retinalen Pigmentepithel zugewandten Seite, mehr Fenster lokalisiert sind als in der äußeren Seite.

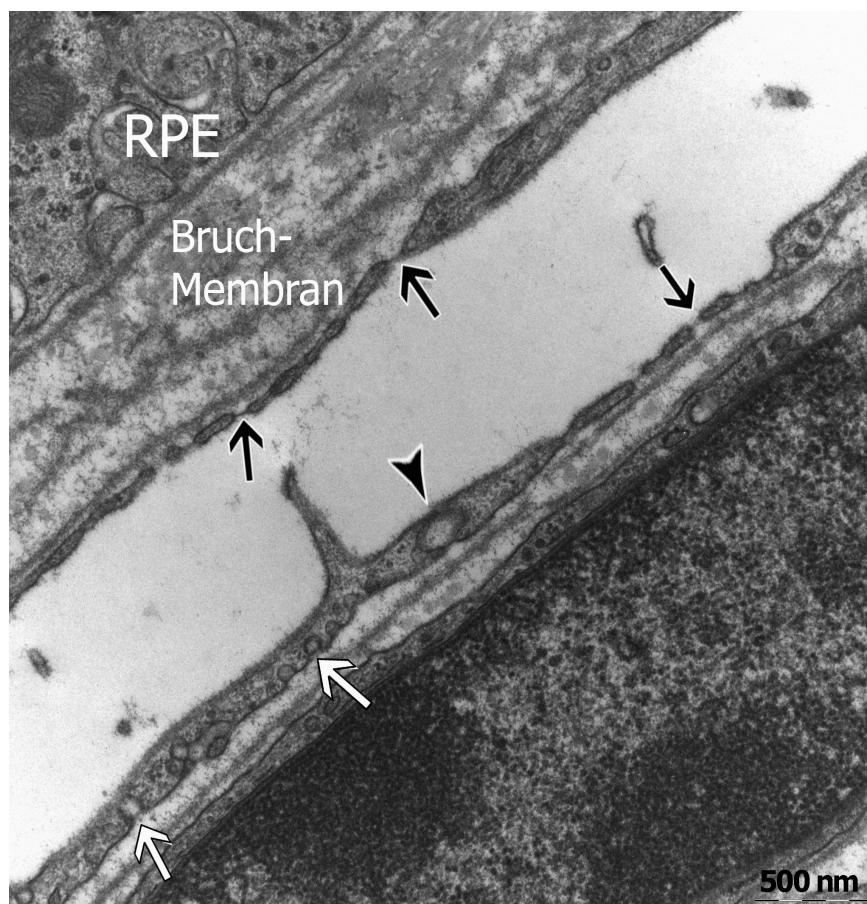


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Choriocapillaris, die der Bruch-Membran sowie dem RPE (retinales Pigmentepithel) unterliegt. Auf beiden Seiten des Gefäßes sind plasmalemmale Strukturen zu erkennen: Caveolae mit *Stomatal Diaphragmas* (weißer Pfeil), Transendotheliale Kanäle (TEC) mit *Stomatal Diaphragmas* (schwarze Pfeilspitze) sowie zahlreiche Fenster mit *Fenestral Diaphragmas* (schwarzer Pfeil).

3 Ergebnisse

Für die positive PV-1-Färbung im Ziliarkörper waren Caveolae mit *Stomatal Diaphragmas* sowie Fenster mit *Fenestral Diaphragmas* im Stratum vasculosum verantwortlich:

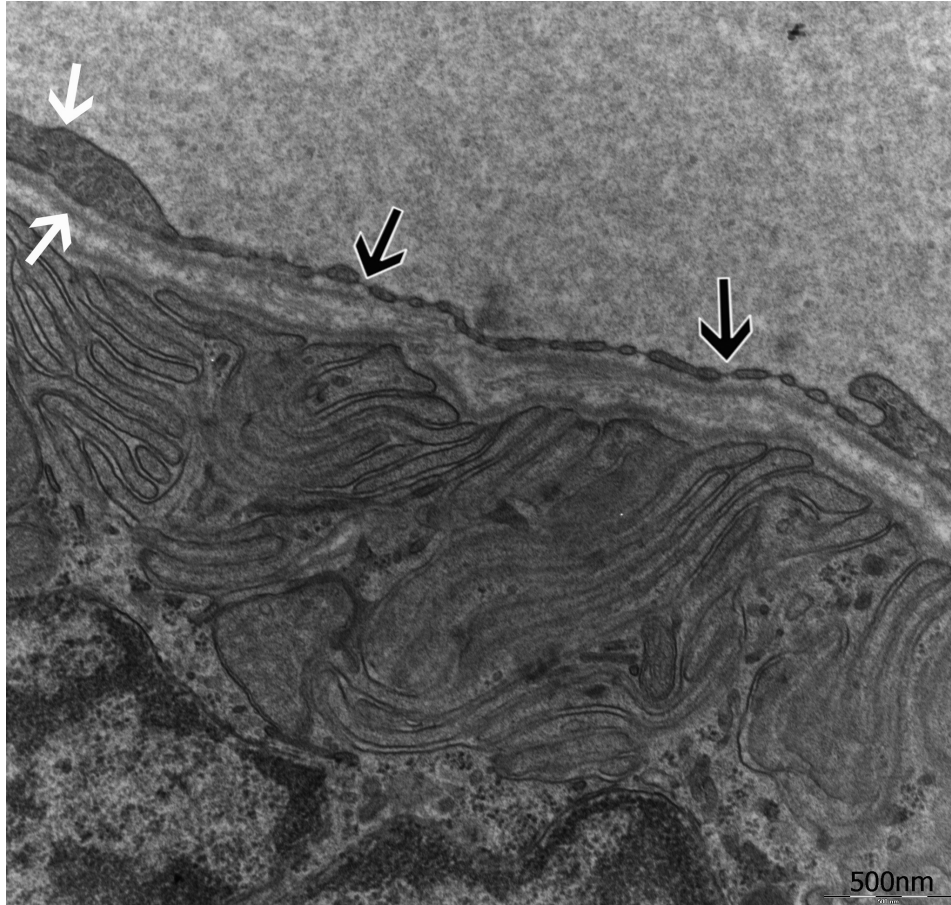


Abbildung 29: Ausschnitt aus dem Endothel des Stratum vasculosum im Ziliarkörper mit Caveolae, die sowohl in der abluminalen als auch in der luminalen Zellmembran lokalisiert sind und z.T. von *Stomatal Diaphragmas* abgedeckt werden (weiße Pfeile); außerdem sind zahlreiche Fenster mit *Fenestral Diaphragmas* (schwarze Pfeile) zu erkennen.

In den episkleralen Venen, die im Rahmen der Fluoreszenz-Immunhistochemie regelmäßig eine ähnlich starke Färbung wie etwa der Ziliarkörper aufwiesen, konnten als ursächliche Strukturen in der Plasmamembran lediglich *Stomatal Diaphragmas* über Caveolae, jedoch keine Transendothelialen Kanäle mit *Stomatal Diaphragmas* oder Fenster mit *Fenestral Diaphragmas* ermittelt werden.

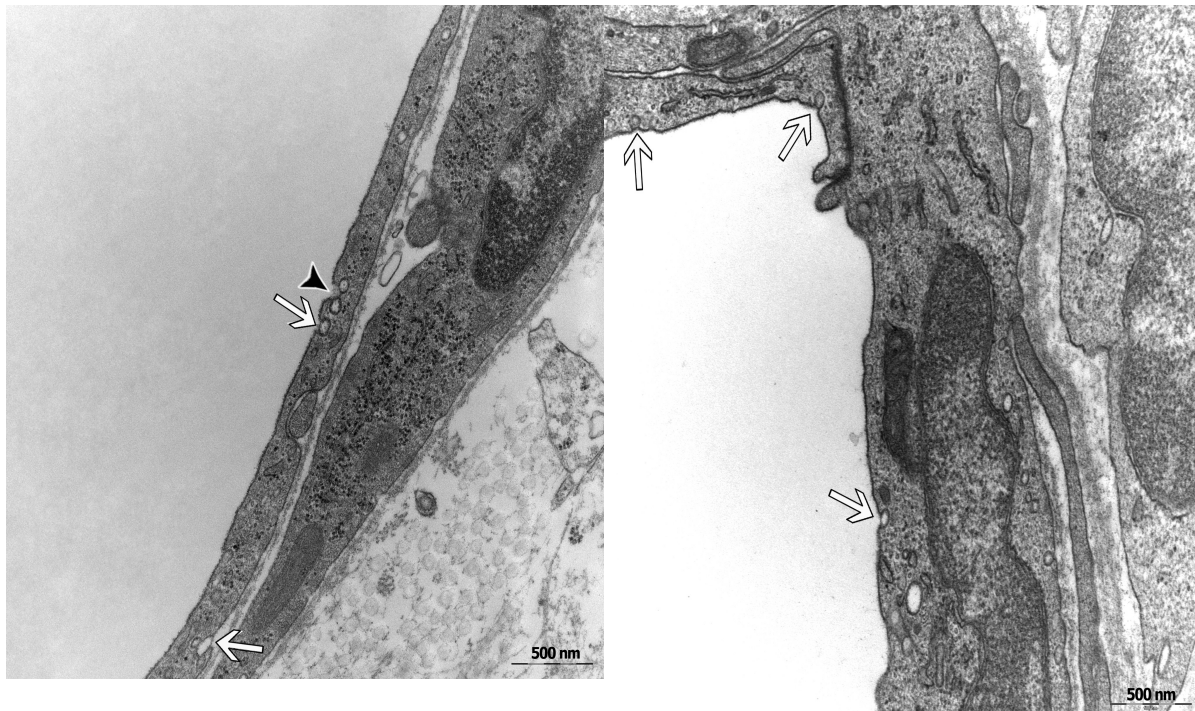


Abbildung 30: Zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen von episkleralen Venen mit Caveolae, die von einem *Stomatal Diaphragma* abgedeckt werden (weiße Pfeile). In der linken Aufnahme verbindet ein Diaphragma zwei nebeneinander liegende Caveolae (schwarze Pfeilspitze).

Nachdem auf mit dem konfokalen Mikroskop angefertigten Aufnahmen des Schlemm-Kanals eine Differenzierung der beiden Wände des Kanals möglich ist, interessiert nun, welche Plasmamembranstrukturen im jeweiligen Fall die PV-1-positive Färbung bewirken. In der äußeren Wand des Kanals sind in der überwiegenden Anzahl Caveolae mit *Stomatal Diaphragmas* bzw. Caveolencuster lokalisiert, vereinzelt waren Fenster mit *Fenestral Diaphragmas* aufzufinden (Abb. 31 und 32).

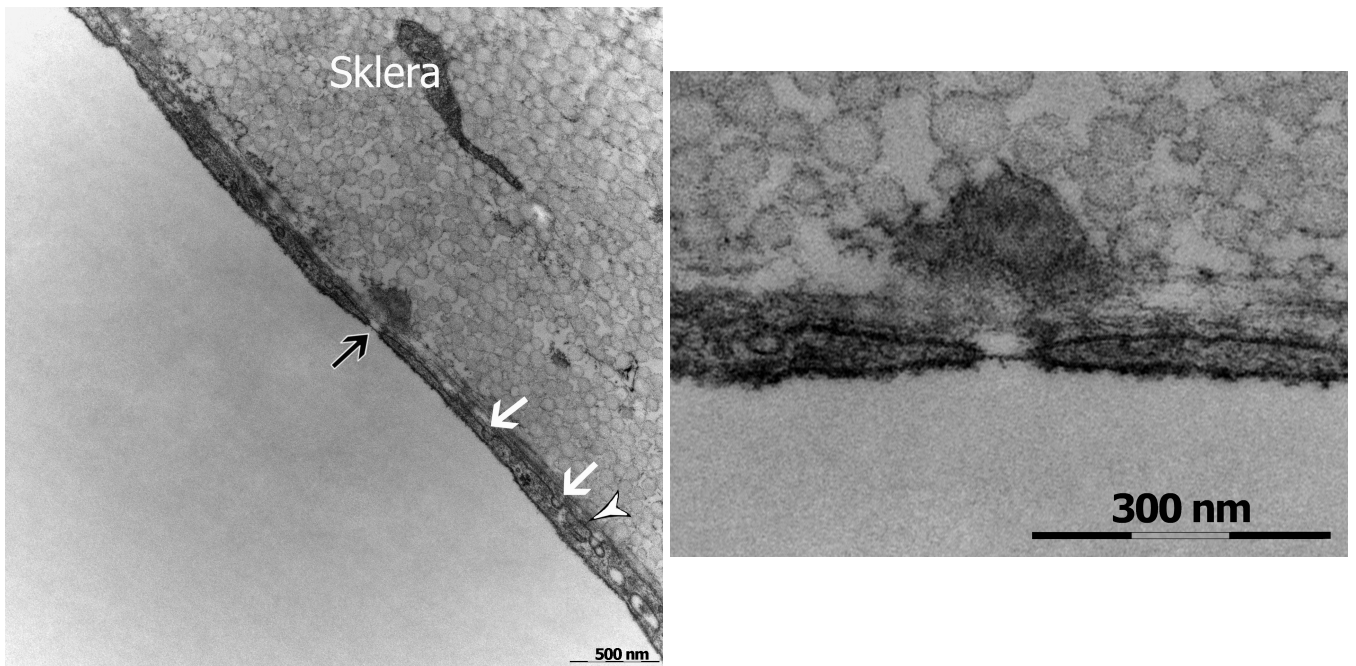


Abbildung 31: Äußere Wand des Schlemm-Kanals mit angrenzender Sklera; im linken Bild sind diverse Caveolae mit *Stomatal Diaphragmas* (weiße Pfeile), ein Caveolencuster (weiße Pfeilspitze) sowie ein Fenster mit einem *Fenestral Diaphragma* (schwarzer Pfeil) zu sehen. Das Fenster mit seinem FD wurde herausvergrößert, sein Durchmesser beträgt weniger als 100 nm (Abbildung rechts).

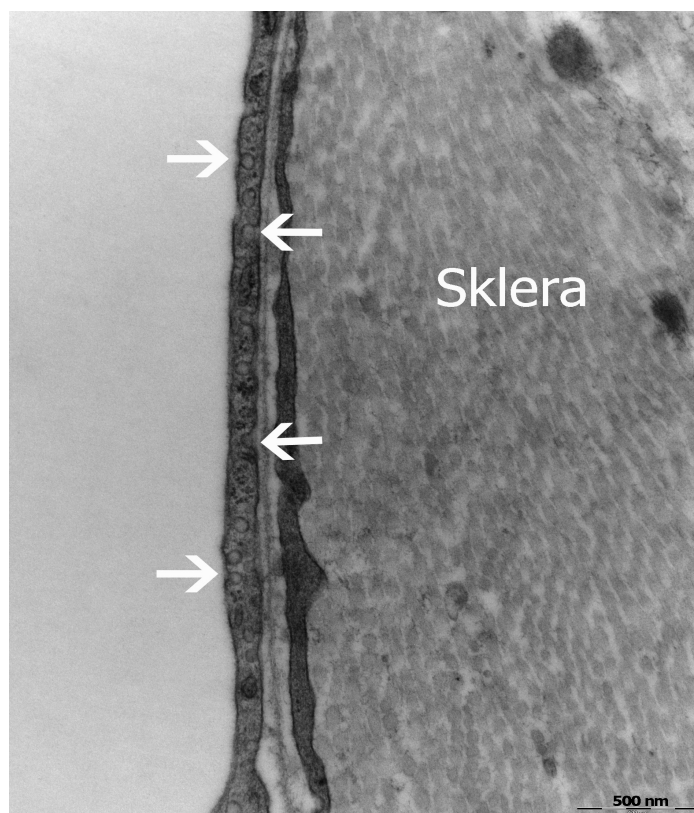


Abbildung 32: Anschnitt der äußeren Wand des Schlemm-Kanals mit angrenzender Sklera; mit weißen Pfeilen sind sowohl auf der luminalen als auch auf der abluminalen Seite der Endothelzelle vier der zahlreichen Caveolae mit ihren *Stomatal Diaphragmas* markiert.

In der inneren Wand des Schlemm-Kanals finden sich bei Betrachtung eines perfundierten Mauseuges erwartungsgemäß in großer Anzahl die in Kapitel 1.4.2 vorgestellten *Giant vacuoles*.

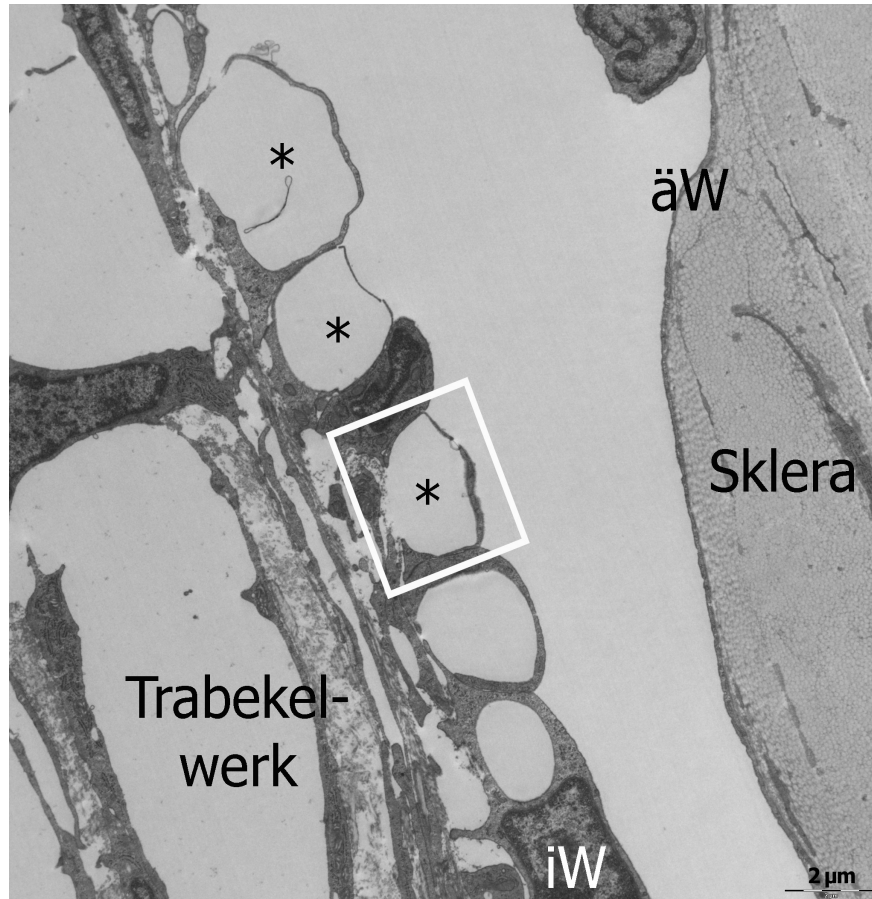


Abbildung 33: Übersicht mit Blick auf die beiden Wände des Schlemm-Kanals sowie angrenzende Strukturen. Während die Endothelzellen der äußeren Wand (äW) relativ abgeflacht der Sklera aufliegen, bilden die Endothelzellen der inneren Wand (iW) großblasige Protrusionen, die sog. *Giant Vacuoles* (*).

Zum Blick auf die Strukturen innerhalb der Plasmamembran wurde die in Abb. 33 markierte Riesenvakuole herausvergrößert (Abb. 34). Hier und auch in anderen *Giant vacuoles* fanden sich Caveolae mit *Stomatal Diaphragmas* sowie solitär Fenster mit *Fenestral Diaphragmas*.

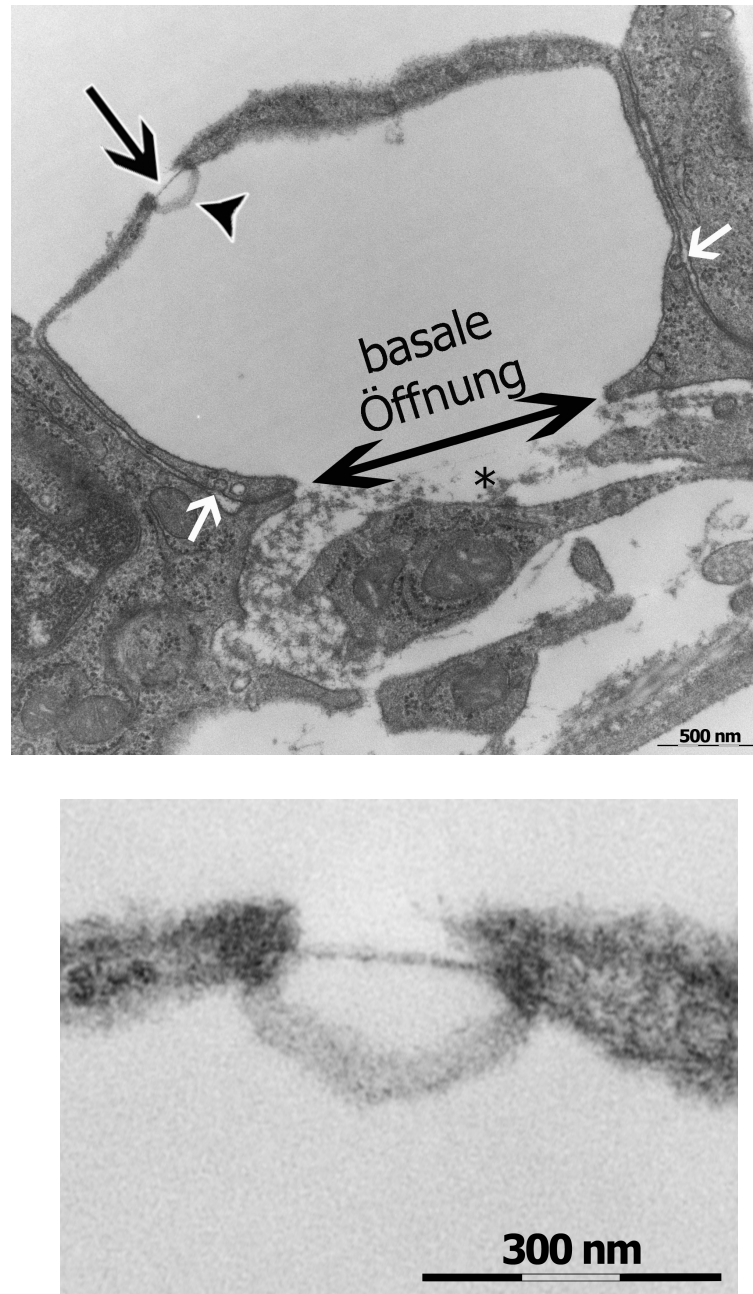


Abbildung 34: Oberes Bild: Blick auf die in Abb. 33 mit einem Rechteck markierte Riesenvakuole; im basalen Bereich der Endothelzelle, die sich fast komplett von der diskontinuierlichen Basalmembran (*) abgehoben hat, entsteht eine basale Öffnung. In der Plasmamembran der enorm abgeflachten Endothelzelle bilden sich Caveolae mit *Stomatal Diaphragmas* (weiße Pfeile), an der dem Lumen des Schlemm-Kanals zugewandten Seite erkennt man ein Fenster, das von einem *Fenestral Diaphragma* abgedeckt wird (schwarzer Pfeil) und im unteren Bild vergrößert dargestellt ist. Bei der mit einer schwarzen Pfeilspitze gekennzeichneten Struktur könnte es sich um den Rest einer Glykokalyx handeln, die in diesem Präparat auch an den übrigen Regionen der Plasmamembran relativ gut erhalten zu sein scheint. Bei höherer Vergrößerung im unteren Bild lässt sich der Durchmesser des Fensters abschätzen: Er beträgt mehr als 100 nm.

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine der in Kapitel 1.4.2 vorgestellten transzellulären Poren am luminalen Pol der *Giant Vacuoles* lokalisiert werden.

3.3 Tabellarischer Überblick über die im Rahmen der Arbeit untersuchten Kombinationen aus Fixierung, Einbettung sowie Spezies

Tabelle 4: Übersicht über die bei den jeweiligen Spezies verwendeten Fixierungen, Einbettungen sowie Antikörperversärfungen

(PRE=Preembedding-Verfahren; falls Verfahren nicht erwähnt, handelt es sich um das Postembedding-Protokoll; EM=Elektronenmikroskopie)

Spezies	Fixierung	Einbettung	1. Antikörper	2. Antikörper
Maus	unfixiert	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Maus	unfixiert, Nachfixierung mit PLP-Nakane bei verschiedenen pH-Werten	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Maus	unfixiert, Nachfixierung mit 1% PFA/2% GA	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Maus	unfixiert, mit NaCl perfundiert	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Maus	2% PFA perfundiert	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Maus	Methyl-Carnoy	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Maus	Ethyl-Carnoy z.T. perfundiert	Gefriereinbettung	1:100 1:20	1:800 1:100
Maus	Ethyl-Carnoy Vorverdauung mit Trypsin, Proteinase K, Pronase, Citrat	Technovit 8100	1:50, 1:100	1:800
Maus	Ethyl-Carnoy	LR-White	1:25 - 1:100	1:100 - 1:800
Maus	Ethyl-Carnoy	Technovit 8100	1:100	1:800
Maus	Ethyl-Carnoy	Technovit 9100	1:50 - 1:200	1:800
Maus	1% PFA	Technovit 8100	1:100	1:800

3 Ergebnisse

Maus	1% PFA	Technovit 9100	1:50 - 1:200	1:800
Maus	2% PFA perfundiert, z.T. + 30 Min. immersionsfix.	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Maus	PLP-Nakane pH 7,4 perfundiert, z.T. + 24 h immersionsfixiert	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Maus auf Grid für EM	PLP-Nakane pH 7,4 perfundiert, z.T. + 24 h immersionsfixiert	LR-White	1:20, 1:50	1:100 US Gold gtart
Maus PRE	unfixiert	Epon	1:50 bei 37°C	1:50 bei 37°C
Maus PRE	Ethyl-Carnoy	Epon	1:100	1:100 US gold gtart
Maus PRE	Ethyl-Carnoy	Technovit 8100	1:100	1:100 US gold gtart
Maus PRE	1% PFA	Epon	1:100	1:100 US gold gtart
Maus PRE	1% PFA	Technovit 8100	1:100	1:100 US gold gtart
Maus PRE	PLP-Nakane pH 7,4 perfundiert, z.T. + 24 h immersionsfixiert	Epon	1:50	1:75 US gold gtart
Maus PRE	PLP-Nakane pH 7,4 perfundiert, z.T. + 24 h immersionsfixiert	LR-White	1:50	1:75 US gold gtart
Schwein	unfixiert	Gefriereinbettung	1:100	1:800
Mensch	unfixiert	Gefriereinbettung	1:50 - 1:200 bei RT, bei 37°C	1:800 bei RT, bei 37°C
Mensch	Ethyl-Carnoy	Gefriereinbettung	1:50- 1:200 bei RT, bei 37°C	1:800 bei RT, bei 37°C

Die in der Tabelle aufgeführten, jedoch in 3.1 oder 3.2 nicht erwähnten Kombinationen führten zu keiner spezifischen Antigenerkennung durch panECA. Bei

3 Ergebnisse

den Versuchen an Schweine- bzw. Menschaugen fiel auf, dass panECA nicht in der Lage ist, PV-1 in den Gefäßen dieser Spezies zu erkennen.

4 Diskussion

Die Befunde der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass das Endothel des Schlemm-Kanals PV-1 exprimiert. Da weiterhin elektronenmikroskopisch Caveolae mit *Stomatal Diaphragmas* und Fenestrae mit *Fenestral Diaphragmas* nachgewiesen werden können, folgern wir, dass PV-1, ähnlich wie in anderen Geweben des Organismus, auch in den Gefäßen des Auges ein wichtiger Bestandteil der Diaphragmata ist. Die Tatsache, dass im Mausauge PV-1 von uns des Weiteren in fenestrierten Kapillaren wie der Choriocapillaris und dem Stratum vasculosum des Ziliarkörpers nachgewiesen werden konnte, nicht aber in den nicht-fenestrierten Gefäßen der Iris und der Retina, unterstützt diese Hypothese. Allerdings wurde eine positive Färbung von PV-1 auch in den episkleralen Venen beobachtet, in denen wir elektronenmikroskopisch keine Fenster mit *Fenestral Diaphragmas*, jedoch Caveolae mit *Stomatal Diaphragmas* nachweisen konnten.

Der Nachweis der Expression von PV-1 erfolgte immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper panECA (MECA-32), der von anderen Autoren bereits gut auf seine Spezifität getestet worden war (Shue et al. 2008). Unsere Befunde ergaben, dass das Epitop, gegen das sich der Antikörper panECA richtet, sehr empfindlich gegenüber verschiedenen Fixationslösungen ist. Diejenigen Fixierungen, die die Oberfläche des Epitops unverändert bewahrten, gewährleisteten keine ausreichende Strukturhaltung für eine elektronenmikroskopische Beurteilung, während die glutaraldehydhaltigen Fixantien zwar die Gewebestruktur gut konservierten, jedoch das Epitop des PV-1 für den monoklonalen Antikörper wohl derart veränderten, dass keine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion mehr möglich war. Dieses Problem führte dazu, dass ein direkter elektronenmikroskopischer Nachweis der Lokalisation von PV-1 in Diaphragmata nicht gelang.

Bislang wurden fensterähnliche Strukturen im Schlemm-Kanal nur anekdotisch beim Affen beschrieben (Inomata et al. 1972), während Poren mit weiten Durchmessern (0,1-2,0 μm), aber ohne Diaphragmenbedeckung als Charakteristikum des Schlemm-Kanals gelten (Bill und Mäepea 1994). Inomata et al. (1972) hatten allerdings die Vermutung geäußert, dass kleine Fenster bzw. diaphragmenbedeckte Poren Vorstufen der großen Poren in den *Giant Vacuoles* seien, die ihre Diaphragmata

aufgrund mechanischer Zerreißung verlören, wenn Kammerwasser hindurchfließe. Dieser Prozess könnte durch die Bildung der *Giant Vacuoles* und die dadurch bedingte enorme lokalisierte Abflachung der Endothelzelle begünstigt werden. *Giant Vacuoles* sind Abhebungen des Schlemm-Kanal-Endothels, die sich bilden, wenn Kammerwasser fließt, die jedoch nicht oder kaum nachweisbar sind, falls das Auge ohne Kammerwasserfluss über die innere Wand des Kanals fixiert wurde. Als Grund wird angenommen, dass beim Endothel des Schlemm-Kanals im Gegensatz zu anderen Gefäßendothelien die Passage der zu transportierenden Flüssigkeit von basal nach apikal erfolgt, was eine lokalisierte Abhebung des Endothels von der Basallamina bedingt, die sowieso beim Schlemm-Kanal nur unvollständig ausgebildet ist.

Unterstützung gewinnt die genannte Hypothese der Porenbildung aus Fenstern durch unsere Betrachtung der im Schlemm-Kanal identifizierten Fenster, bei der auffiel, dass die Fenster in der inneren Wand einen größeren Durchmesser als diejenigen in der äußeren Wand zu haben scheinen. Um jedoch abschließend beurteilen zu können, ob diese vergrößerten Fenster in den *Giant Vacuoles* eventuell Intermediärformen auf dem Weg zu den Poren darstellen, müssten Serienschnitte durch die innere Wand des Kanals angefertigt werden, vor allem, da in dieser Arbeit bei der Betrachtung der Riesenvakuolen keine der zahlreich in der Literatur beschriebenen Poren beobachtet werden konnten.

Sit et al. (1997) konnten zeigen, dass die Formation von Poren von der Menge der Fixationsflüssigkeit sowie der Zeitspanne, die post mortem bis zur Perfusion verstreicht, abhängig ist. Diese Befunde legen nahe, dass ein großer Teil der Poren Artefakte darstellen. Dies ist besonders bedeutungsvoll, da seit den Arbeiten von Svedbergh und Bill (1972), die zeigen konnten, dass maximal 10% des Widerstandes durch Poren entstehen, angenommen wurde, dass sich das Endothel des Schlemm-Kanals aufgrund seiner hohen Leitfähigkeit nicht direkt am Abflusswiderstand beteiligt.

Prinzipiell wäre es somit möglich, dass alle Poren Artefakte sind, während die von uns beobachteten Fenster essentiell für den Kammerwasserdurchfluss sind. Ein

parazellulärer Fluss wird als unwahrscheinlich angenommen, da Schlemm-Kanal-Zellen Tight Junctions ausbilden.

Gegen ein völliges Fehlen von Poren spricht neben Ergebnissen von Hamanka und Bill (1987), die bei Widerstandsmessungen nach Zerreißung der inneren Wand einen weitaus größeren als den genannten 10% entsprechenden Widerstandsverlust erkennen ließen, auch die Tatsache, dass wir die Diaphragmata im Schlemm-Kanal-Endothel wesentlich seltener fanden als in den Gefäßen der Choriocapillaris und des Ziliarkörpers, die eine geringere Leitfähigkeit bzw. hydraulische Konduktivität aufweisen. Weiterhin deuten Befunde von Inomata et al. (1972) sowie Johnson et al. (1990), die Moleküle verschiedener Durchmesser über die innere Wand passieren ließen, darauf hin, dass zumindest einige Poren existieren, da nach Perfusion Moleküle mit einem Durchmesser bis zu 0,5 µm im Lumen des Schlemm-Kanals nachweisbar waren.

Anzunehmen ist eher, dass ein dynamischer Prozess vorliegt, bei dem es zunächst zur Bildung von mit Diaphragmata bedeckten Poren kommt, die sich dann bei vermehrtem Fluss zu großen Poren öffnen. Dadurch dass in dieser Arbeit erstmalig ein Molekül identifiziert wurde, das zur Bildung von Diaphragmata und damit letzten Endes großer Poren notwendig ist, sollte es konsequent auch zum ersten Mal möglich sein, gentechnisch die Entstehung von Poren bei der Maus experimentell zu beeinflussen oder zu verhindern, und auf diesem Wege direkt im Tiermodell die lang diskutierte Frage nach der Bedeutung von Poren einer Klärung näher zu bringen. Differenzierteren Aufschluss über die genaue Bedeutung des PV-1 bei der Porenbildung in den *Giant vacuoles* sollten Versuche an Augen von PV-1^{-/-} Mäusen liefern. Dabei ließen sich womöglich auch weitere Lösungsansätze auf die Frage nach dem Modus und der Lokalisation des Kammerwasserabflusswiderstandes finden sowie eine experimentelle Prüfung des in 1.4.3 beschriebenen *funneling*-Effektes durchführen. Interessant wäre in diesen Zusammenhang auch, ob sich der transzelluläre Transport über Endothelien in ähnlicher Weise wie nach dem Knockdown von Caveolin 1 verändert (Drab et al. 2001) und inwiefern die Fensterentstehung im Organismus in vergleichbarer Weise wie in Zellexperimenten quantitativ und qualitativ beeinträchtigt wird (Ioannidou et al. 2006, Stan et al.

2004). Da selbst der Knockdown des Caveolin 1 keinen letalen Phänotyp zur Folge hat, ist auch bei den PV-1-/-Mäusen eine Überlebensfähigkeit anzunehmen. Aufgrund der Tatsache, dass Johnson et al. (2002) bei Perfusionsversuchen von Glaukompatienten eine um den Faktor 5 verminderte Anzahl an Poren in der inneren Wand des Schlemm-Kanals im Vergleich zu nichtglaukomatösen Spenderaugen fanden, sollte untersucht werden, ob sich in glaukomatösen Augen das Molekül PV-1, das für die Porenbildung wichtig ist, in veränderter Expression nachweisen lässt und ob dieses eventuell ursächlich an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt ist.

5 Zusammenfassung

Der Abfluss des Kammerwassers aus dem Auge erfolgt zum größten Teil über das Trabekelwerk in den Schlemm-Kanal. Hierzu bildet das Endothel der Kanalwand transiente etwa 1 µm große Poren aus, deren molekulare Struktur völlig ungeklärt ist. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das Membranprotein PV-1 (*Plasmalemmal Vesicle Associated Protein-1*) auch im Endothel des Schlemm-Kanals nachweisbar ist. PV-1 ist ein wichtiges Strukturprotein der Diaphragmata der Fenster von fenestrierten Kapillaren.

PV-1 wurde immunhistochemisch im Auge der Maus mit spezifischen Antikörpern dargestellt, wobei verschiedene Fixationsprotokolle getestet wurden. Für Doppelmarkierungen wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD-31, einem Marker für Endothelzellen, durchgeführt. Die Präparate wurden mit konfokaler Mikroskopie analysiert. In parallelen Experimenten wurde das Endothel des Schlemm-Kanals der Maus elektronenmikroskopisch untersucht.

Die deutlichste und spezifischste Immunreaktivität für PV-1 wurde nach Fixation in Paraformaldehyd oder Ethyl-Carnoy und anschließender Gefriereinbettung beobachtet, während Fixationen mit Glutaraldehyd oder Einbettungen in Technovit oder Epon keine spezifische Markierung von PV-1 zuließen. Als PV-1-positiv erwiesen sich die Endothelien der Choriocapillaris, der Kapillaren des Ziliarkörpers, der episkleralen Venen sowie das Endothel der äußeren und inneren Wand des Schlemm-Kanals. In den intraretinal gelegenen Gefäßen und denen der Iris fanden sich ausschließlich PV-1-negative Endothelien. Die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte das Vorkommen von Fenstern in den Kapillaren der Choriocapillaris und des Ziliarkörpers, und vereinzelt im Endothel des Schlemm-Kanals. In den episkleralen Venen fanden sich keine Fenestrationsen, aber Caveolae mit sog. *Stomatal Diaphragmas*, die bekannterweise auch PV-1 enthalten.

Aufgrund unserer Ergebnisse vermuten wir, dass die typischen Poren des Schlemm-Kanals aus Fenstern mit Diaphragmata hervorgehen, und dass PV-1 ein wichtiges Strukturelement dieser Poren darstellt. Insgesamt bereiten diese Befunde gentechnische Untersuchungen zur Modifikation von PV-1 im Mauseye vor, die

weitere experimentelle Erkenntnisse zur Porenbildung im Schlemm-Kanal und zur Biomechanik des Kammerwasserabflusses liefern sollten.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch kontinuierliches Endothel mit umgebender durchgehender Basalmembran (aus Drenckhahn 2004).....	2
Abbildung 2: Schematischer Querschnitt durch fenestriertes Endothel (aus Drenckhahn 2004).....	3
Abbildung 3: Gefrierbruch eines fenestrierten Kapillarendothels im Jejunum einer Ratte (nach Simionescu et al. 1974).....	4
Abbildung 4: Gegenüberstellung der zwei Typen des diskontinuierlichen Endothels mit unterbrochenen Basalmembranen (nach Drenckhahn 2004). 5	
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Caveolen an der luminalen und abluminalen Seite einer Endothelzelle, in ihrer Anordnung einzeln oder zu mehreren in sog. „Clustern“ (nach Drenckhahn 2004).....	7
Abbildung 6: Darstellung des Aufbaus einer Caveola mit ausgewählten Transportern (nach Drenckhahn 2004).....	8
Abbildung 7: Computergestützte dreidimensionale Rekonstruktion einer die gesamte Endothelzelle durchspannenden VVO in einer Venule der Haut einer Maus (aus Feng et al. 2002).....	12
Abbildung 8: Schema der Entstehung eines TEC aus der Fusion zweier Vesikel an gegenüberliegenden Plasmamembranen (eigene Darstellung nach Gumbleton et al. 2000).....	13
Abbildung 9: Modell des „Zusammenfallens“ eines TEC zu einem Fenster mit enormer Abflachung der Endothelzelle in diesem Bereich (eigene Darstellung nach Bildern und Inhalten von Palade und Bruns 1968, Stan 2002).....	15
Abbildung 10: Schematische Darstellung eines fenestrierten Endothels mit FD über den Fenstern sowie erkennbarer Glykokalyx (nach Drenckhahn 2004)	15
Abbildung 11: Dreidimensionale Übersichtszeichnung mit Blick auf den Kammerwinkel und die am Kammerwasserabfluss beteiligten Strukturen (nach Sachsenweger 2003).....	17
Abbildung 12: Weg des Kammerwassers durch das Auge: Nach Produktion durch die Ziliarkörperzotten in der hinteren Augenkammer gelangt das Kammerwasser über die Pupille in die vordere Augenkammer, wo es auf trabekulärem oder uveoskleralem Weg abfließt (nach Sachsenweger 2003)	18

- Abbildung 13: Dreidimensionale Schemazeichnung des Endothels der inneren Wand des Schlemm-Kanals mit den angrenzenden Zellschichten des Trabekelwerks (nach Inomata et al. 1972).....20
- Abbildung 14: Schemazeichnung eines Ausschnittes der inneren Wand des Schlemm-Kanals mit *Giant Vacuoles* (GV), diskontinuierlicher Basalmembran und darunterliegendem juxtakanalikulärem Bindegewebe (eigene Schemazeichnung nach Bildern von Inomata et al. 1972).....21
- Abbildung 15: Zusammenhang zwischen dem transendothelialen Druck in mmHg und der Fläche an gebildeten GV bei Perfusion einer Zellschicht aus menschlichen Schlemm-Kanal-Endothelzellen (aus Alvarado 2004).....22
- Abbildung 16: Einmalige Beschreibung einer von einem Diaphragma bedeckten „porenähnlichen“ Struktur (Durchmesser 0,6 µm) in der inneren Wand des Schlemm-Kanals eines Cynomolgus-Affen (modifiziert nach Inomata et al. 1972).....24
- Abbildung 17: Schema des sog. *funneling*- oder auch „Trichtereffektes“, nach dem die Poren in der inneren Wand des Schlemm-Kanals die Bündelung des Kammerwasserflusses im juxtakanalikulären Bindegewebe bewirken. Dadurch wird die reale Abflussfläche verkleinert, der Widerstand erhöht (nach Johnson 2006).....28
- Abbildung 18: Schema der Membranverankerung und der Struktur des PV-1-Monomers (nach Stan 2007).....30
- Abbildung 19: Modell des PV-1-Dimers mit Verankerung in der Plasmamembran (nach Stan 2007).....30
- Abbildung 20: Links das Arbeitsmodell einer Aufsicht auf ein Diaphragma bestehend aus acht PV-1-Dimeren; rechts zum Vergleich eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines *Fenestral Diaphragmas* in der Aufsicht (nach Stan 2007).....32
- Abbildung 21: Ausschnitt aus der vorderen Augenkammer eines Mauseuges, das mit 2% PFA perfusionsfixiert wurde (ohne weitere Immersionsfixierung), Gefriereinbettung.....55
- Abbildung 22: Kammerwinkel mit Kammerwasserabflussgefäßen eines Mauseuges; Perfusionsfixierung mit 2% PFA ohne weitere Immersionsfixierung, Gefriereinbettung.....56
- Abbildung 23: Negativkontrolle der Doppelfärbung von PV-1 (A) und CD-31 (B) an Schnitten durch die vordere Augenkammer eines Mauseuges im direkten Vergleich zu Abb. 22; Perfusionsfixierung mit 2% PFA ohne weitere Immersionsfixierung, Gefriereinbettung.....57
- Abbildung 24: In der Einzelfärbung ein Ausschnitt aus der korneoskleralen Übergangszone mit den angrenzenden Strukturen eines mit Ethyl-Carnoy fixierten Mauseuges, Gefriereinbettung.....58
- Abbildung 25: Doppelfärbung an Schnitten eines unfixierten Mauseuges, die auf den Objektträgern 5 Minuten mit 2% PFA nachfixiert wurden

(Gefriereinbettung); Blick auf einen Ausschnitt der vorderen Augenkammer	59
Abbildung 26: Schnitt durch die Retina eines unfixierten gefriereingebetteten Mausauges.....	60
Abbildung 27: Aufnahme eines Schnittes durch ein mit Ethyl-Carnoy fixiertes und gefriereingebettetes Mausauge mittels eines konfokalen Mikroskops..	61
Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Choriocapillaris, die der Bruch-Membran sowie dem RPE unterliegt.....	62
Abbildung 29: Ausschnitt aus dem Endothel des Stratum vasculosum im Ziliarkörper.....	63
Abbildung 30: Zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen von episkleralen Venen.....	64
Abbildung 31: Äußere Wand des Schlemm-Kanals mit angrenzender Sklera....	65
Abbildung 32: Anschnitt der äußeren Wand des Schlemm-Kanals mit angrenzender Sklera.....	65
Abbildung 33: Übersicht mit Blick auf die beiden Wände des Schlemm-Kanals sowie angrenzende Strukturen.....	66
Abbildung 34: Blick auf die in Abb. 33 mit einem Rechteck markierte Riesenvakuole	67

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die bei den jeweiligen Einbettungen verwendeten Methoden.....	41
Tabelle 2: Schematischer Überblick über das Protokoll der Fluoreszenz-Färbung im Rahmen des Postembedding-Verfahrens.....	50
Tabelle 3: Schematischer Überblick über das Protokoll der durchgeführten Preembedding-Verfahren.....	51
Tabelle 4: Übersicht über die bei den jeweiligen Spezies verwendeten Fixierungen, Einbettungen sowie Antikörperverdünnungen	68

6.3 Literaturverzeichnis

- Alvarado JA, Betanzos A, Franse-Carman L, Chen J, Gonzalez-Mariscal L (2004): Endothelia of Schlemm's Canal and trabecular meshwork: distinct molecular, functional, and anatomic features. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C621-C634
- Apkarian RP (1997): The fine structure of fenestrated adrenocortical capillaries revealed by in-lens field-emission scanning electron microscopy and scanning transmission electron microscopy. *Scanning* 19(5):361-7
- Ballermann BJ, Stan RV (2007): Resolved: capillary endothelium is a major contributor to the glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol* 18(9):2432-38
- Bendayan M (2002): Morphological and cytochemical aspects of capillary permeability. *Microsc Res Tech* 57: 327-349
- Bill A, Mäepea O: Mechanisms and routes of aqueous humor drainage. In: Albert DM, Jakobiec FA (Hrsg) (1994): Principles and Practice of Ophthalmology. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company, 1:206-26
- Bill A, Svedbergh B (1972): Scanning electron microscopic studies of the trabecular meshwork and the canal of schlemm-an attempt to localize the main resistance to outflow of aqueous humor in man. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 50(3):295-320
- Bradley JM, Vranka J, Colvis CM, Conger DM, Alexander JP, Fisk AS, Samples JR, Acott TS (1998): Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(13):2649-58
- Brilakis HS, Johnson DH (2001): Giant vacuole survival time and implications for aqueous humor outflow. *J Glaucoma* 10(4):277-83
- Bron AJ, Tripathi RC, Tripathi BJ: Anterior chamber and drainage angle. In (1997): Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit, 8th Edition. Chapman and Hall Medical London, UK, S. 279-307
- Chen J, Braet F, Brodsky S, Weinstein T, Romanov V, Noiri E, Goligorsky MS (2002): VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(5):C1053-63
- Davis MG, Hagen PO (1993): The Vascular Endothelium - A New Horizon. *Ann Surg* 218(5):593-609

- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV (2001): Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293(5539):2449-52
- Drenckhahn D (2004): Blutgefäße. In: Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 2, 16. Auflage, Urban&Fischer, München, S.71-97
- Dvorak AM, Feng D (2001): The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 49(4):419-32
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W (1998): Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 140(4):947-59
- Ethier CR (2002): The inner wall of Schlemm's Canal. *Exp Eye Res* 74:161-72
- Ethier CR, Coloma FM, Sit AJ, Johnson M (1998): Two pore types in the inner-wall endothelium of Schlemm's canal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(11):2041-8
- Feng D, Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM (2002): Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals. *Microsc Res Tech* 57(5):289-326
- Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF, Dvorak AM (1996): Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med* 183(5): 1981-6
- Gong H, Ruberti J, Overby D, Johnson M, Freddo TF (2002): A new view of the human trabecular meshwork using quick-freeze, deep-etch electron microscopy. *Exp Eye Res* 75(3):347-58
- Grant WM (1963): Experimental aqueous perfusion in enucleated human eyes. *Arch Ophthalmol* 69:783-801
- Gumbleton M, Abulrob AG, Campbell L (2000): Caveolae: an alternative membrane transport compartment. *Pharm Res* 17(9):1035-48
- Hann CR, Springett MJ, Johnson DH (2001): Antigen Retrieval of Basement

- Membrane Proteins form Archival Eye Tissues. *J Histochem Cytochem* 49(4):475-482
- Ilan N, Madri JA (2003): PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Bio* 15(5):515-24
- Inomata H, Bill A, Smelser GK (1972): Aqueous humor pathways through the trabecular meshwork and into Schlemm's canal in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*). An electron microscopic study. *Am J Ophthalmol* 73(5): 760-89
- Ioannidou S, Deinhardt K, Miotla J, Bradley J, Cheung E, Samuelsson S, Ng YS, Shima DT (2006): An in vitro assay reveals a role for the diaphragm protein PV-1 in endothelial fenestra morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(45):1677-5
- Jaffe, EA (1987): Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 18(3):234-239
- Johnson M (2006): What controls aqueous humour outflow resistance? *Exp Eye Res* 82:545-57
- Johnson M, Chan D, Read AT, Christensen C, Sit A, Ethier CR (2002): The pore density in the inner wall endothelium of Schlemm's canal of glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(9):2950-5
- Johnson M, Erickson K (2000): Mechanisms and routes of aqueous humor drainage. In: Albert DM, Jakobiec FA (Hrsg.): Principles and Practice of Ophthalmology, Philadelphia, PA, W.B. Saunders Co, S. 2577--95
- Johnson M, Johnson DH, Kamm RD, DeKater AW, Epstein DL (1990): The filtration characteristics of the aqueous outflow system. *Exp Eye Res* 50(4):407-18
- Johnson M, Shapiro A, Ethier CR, Kamm RD (1992): Modulation of outflow resistance by the pores of the inner wall endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(5):1670-5
- Lüllmann-Rauch R (2006): Kreislauforgane; Zellorganellen und Zytosol. In: Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 237-259 bzw. S. 40-67
- Maniatis NA, Brovkovich V, Allen SE, John TA, Shajahan AN, Tirupathi C, Vogel SM, Skidgel RA, Malik AB, Minshall RD (2006): Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial

cells. *Circ Res* 99(8):870-7

McLean IW, Nakane PK (1974): Periodate-Lysine-Paraformaldehyde Fixative: A new Fixative For Immunoelectron Microscopy, *J Histochem Cytochem* 22(12):1077-1083

Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE (1998): Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141(1):101-14

Oh P, Schnitzer JE (2001): Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell* 12(3):685-98

Overby DR, Stamer WD, Johnson M (2009): The changing paradigm of outflow resistance generation: towards synergistic models of the JCT and inner wall endothelium. *Exp Eye Res* doi:10.1016/j.exer.2008.11.033

Palade GE (1953): Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 24:1424

Palade GE, Bruns RR (1968): Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J Cell Biol* 37(3): 633-49

Ramos RF, Hoying JB, Witte MH, Stamer WD (2007): Schlemm's Canal endothelia, lymphatic, or blood vasculature? *J Glaucoma* 16:391-405

Reeves WH, Kanwar YS, Farquhar MG (1980): Assembly of the glomerular filtration surface. Differentiation of anionic sites in glomerular capillaries of newborn rat kidney. *J Cell Biol* 85(3):735-53

Rippe B, Rosengren BI, Carlsson O, Venturoli D (2002): Transendothelial transport: the vesicle controversy. *J Vasc Res* 39:375-390

Sabanay I, Gabelt BT, Tian B, Kaufman PL, Geiger B (2000): H-7 effects on the structure and fluid conductance of monkey trabecular meshwork. *Arch Ophthalmol* 118:955-962

Sachsenweger M (2003): Vorderkammer und Glaukom. In: Augenheilkunde, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 210-238

Schnitzer JE (2001): Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv*

Rev 49(3):265-80

- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994): Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127(5):1217-32
- Shue EH, Carson-Walter EB, Liu Y, Winans BN, Ali ZS, Chen J, Walter KA (2008): Plasmalemmal vesicle associated protein-1 (PV-1) is a marker of blood-brain barrier disruption in rodent models. *BMC Neurosci* 9:29
- Simionescu M, Simionescu N, Palade GE (1974): Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J Cell Biol* 60(1):128-52
- Sit AJ, Coloma FM, Ethier CR, Johnson M (1997): Factors affecting the pores of the inner wall endothelium of Schlemm's canal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(8):1517-25
- Stan RV (2002): Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc Res Tech* 57(5): 350-64
- Stan RV (2007): Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 11(4):621-643
- Stan RV, Ghitescu L, Jacobson BS, Palade GE (1999a): Isolation, cloning, and localization of rat PV-1, a novel endothelial caveolar protein. *J Cell Biol* 145(6): 1189-98
- Stan RV, Kubitza M, Palade GE (1999b): PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13203-7
- Stan RV, Tkachenko E, Niesman IR (2004): PV1 is a key structural component for the formation of the stomatal and fenestral diaphragms. *Mol Biol Cell* 15(8):3615-30
- Ten Hulzen RD, Johnson DH (1996): Effect of fixation pressure on juxtacanalicular tissue and Schlemm's canal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(1):114-24
- Thomas CM, Smart EJ (2008): Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med* 12(3): 796-809
- Thyberg J (2002): Caveolae and cholesterol distribution in vascular smooth muscle

cells of different phenotypes. *J Histochem Cytochem* 50(2):185-95

Tiruppathi C, Song W, Bergenfeldt M, Sass P, Malik AB (1997): Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 272(41):25968-75

Yang R, Davies CM, Archer CW, Richards RG (2003): Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mater* 6:57-71

6.4 Abkürzungsverzeichnis

α	anti; Angabe, gegen welche Spezies der Antikörper gerichtet ist
Abb.	Abbildung
BM	Basalmembran
bzw.	beziehungsweise
C	Caveola
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dk	<i>donkey</i> , Esel
et al.	und andere
F	Fenster
FD	<i>Fenestral Diaphragma(s)</i>
GA	Glutaraldehyd
gt	<i>goat</i> , Ziege
m	<i>mouse</i> , Maus
Min.	Minute(n)
PFA	Paraformaldehyd
Php	Phosphatpuffer
rb	<i>rabbit</i> , Kaninchen
rt	<i>rat</i> , Ratte
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	<i>Stomatal Diaphragma(s)</i>
sog.	sogenannte(r/s)
TEC	<i>Transendothelial Channel(s)</i>
US	<i>ultrasmall</i>
VVO	Vesikulo-Vakuoläre Organelle
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
x	-fach, mal
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6.5 Curriculum vitae

Persönliches

Name	Kathrin Ebner
Geburtstag	22.10.1985
Geburtsort	Deggendorf

Schulische Ausbildung

1992-1996	Grundschule Achslach (Landkreis Regen)
1996-2005	Dominicus-von-Linprun Gymnasium Viechtach Leistungskurse Mathematik und Chemie

Studium

2005-2007	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, vorklinischer Abschnitt
08/2007-09/2007	Ablegen des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote „sehr gut“ (1,50)
2007-2011	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, klinischer Abschnitt
10/2011-11/2011	Ablegen des zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote „sehr gut“ (1,00)

Doktorarbeit

12/2007-05/2009	Arbeit am Institut für Humananatomie und Embryologie Regensburg, Prof. Tamm Thema: „Die Lokalisation des Membranproteins PV-1 in den Gefäßen des Auges“
-----------------	--

Famulaturen

2008	(Unfall-)Chirurgie (Praxis Dr. Overbeck, Plattling) Gynäkologie (Scarborough Regional Hospital, Tobago, West Indies) Innere Medizin (Scarborough Regional Hospital, Tobago, West Indies) Innere Medizin (Caritaskrankenhaus St. Josef, Regensburg)
2009	Anästhesie (Caritaskrankenhaus St. Josef, Regensburg) Augenheilkunde (Universitätsklinikum Regensburg) Geriatric (Brigham & Women`s Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA)
2010	Pädiatrie (Klinikum Deggendorf) Pädiatrische Intensivmedizin und Hämato-Onkologie (Universitätsklinikum Aachen)

Praktisches Jahr

1. Tertial	Innere Medizin	Universitätsklinikum Regensburg University of California, San Diego, USA
2. Tertial	Pädiatrie	Klinik St. Hedwig, Regensburg Universitätsklinikum Regensburg
3. Tertial	Chirurgie	Barmherzige Brüder Regensburg

Stipendium

seit 02/2006

Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

2010

Stipendium der Universität Regensburg für einen
zweimonatigen Aufenthalt im Rahmen des
Austauschprogramms mit der University of California,
San Diego, USA

6.6 Danksagung

Bei der Reflexion über diese Arbeit gilt mein Dank ganz verschiedenen Personen:

Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm für die Ideengebung des Arbeitsthemas und eine ausgezeichnete Betreuung: die klare Absprache zu Beginn der Arbeit, der stets mögliche Kontakt sowie ausführliche Antworten zu allen meinen Fragen und Anliegen. Sie haben mir das Arbeiten an Ihrem Institut sehr angenehm gemacht!

Dr. rer. nat. Markus Kröber für die Betreuung meiner Arbeiten im Labor, auch wenn dies zu meinem Bedauern nicht über den ganzen Zeitraum der Experimente möglich war. Danke Dir für die gezeigte Unterstützung!

Margit Schimmel und Elke Stauber, den technischen Assistentinnen, ohne die ich nicht hätte arbeiten können und die mich mit viel Geduld und auf Kosten so mancher Nerven anlernten. Euch danke ich für das stets offene Ohr, für jederzeit erhaltene geduldige Erklärungen sowie die persönliche Wärme, die es mir leicht machte.

Angelika Pach, Walter Paper und Martin Gallenberger, die mich das Arbeiten im Labor mit einiger praktischer Hilfe und vielen netten Gesprächen angenehmer erleben ließen.

Dr. med. Joachim Overbeck für seine ehrliche Meinung und die ausgezeichneten Hinweise, was das Schreiben der Arbeit betrifft.

Meinen Eltern, meiner Schwester Stephanie sowie Mathias für die in jeder Beziehung gewährte Unterstützung, das Zureden, das Mutmachen und das Vertrauen, nicht nur im Rahmen der Doktorarbeit.

6.7 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 23.11.2011

Kathrin Ebner